

Title	染色体異常誘発性と大腸菌ファージ不活化からみた上水消毒剤の比較研究(Dissertation_全文)
Author(s)	伊藤, 禎彦
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1993-07-23
URL	http://dx.doi.org/10.11501/3070397
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

新 制

工

925

京大附図

染色体異常誘発性と大腸菌ファージ
不活化からみた上水消毒剤の比較研究

1993年 6月

伊 藤 禎 彦

染色体異常誘発性と大腸菌ファージ
不活化からみた上水消毒剤の比較研究

1993年 6月

伊 藤 禎 彦

目次

	頁
第1章 序論	1
第1節 本研究の目的	1
第2節 本研究の構成	2
第3節 本研究でとりあげる消毒剤とその反応性	7
3.1 塩素	
3.2 二酸化塩素	
3.3 クロラミン	
3.4 オゾン	
参考文献	
第2章 画像解析による異常染色体検出法の開発	18
第1節 画像解析の意義	18
第2節 画像解析方法構築上の方針	18
第3節 異常アトラス染色体の画像解析	21
第4節 実際標本の画像解析	33
4.1 実験方法	
4.2 実験結果	
第5節 結語	38
参考文献	
第3章 画像解析法による消毒処理水の染色体異常試験	40
第1節 消毒処理水の変異原性に関する既往の研究	40
第2節 実験方法	42
第3節 実験結果と考察	48
3.1 各消毒処理水の実験結果	
3.2 まとめと考察	
第4節 塩素と代替消毒剤の比較	64
第5節 結語	65
参考文献	
第4章 大腸菌ファージの不活化に関する実験	69
第1節 大腸菌ファージの分離と群別	69
1.1 ウイルスとファージの形態	
1.2 宿主菌の単離と同定	
1.3 大腸菌ファージの群別	
第2節 大腸菌ファージの不活化実験	73
2.1 実験方法	
2.2 実験結果と考察	
第3節 塩素と代替消毒剤の比較	85
参考文献	

第5章 大腸菌の回復と再増殖に関する実験	88
第1節 本章の目的	88
第2節 BGLB培地による再増殖の観察	89
第3節 TLY寒天培地による回復、再増殖の観察	91
3.1 測定方法について	
3.2 砂ろ過水中での <i>E. coli</i> の塩素処理実験	
3.3 種々の水中での回復と再増殖	
3.4 塩素ダメージ菌に対する残留塩素の影響	
第4節 BGLB-MPN法とTLY寒天法との対応	98
第5節 回復可能菌を含めた消毒	102
第6節 結語	104
参考文献	
第6章 消毒処理水の安全性に関する考察	107
第1節 消毒剤の残留性に関する実験	107
1.1 実験方法	
1.2 実験結果と考察	
第2節 実験結果から結論される消毒処理水の相対的安全性	112
第3節 不活化力と残留性との関係のモデルによる検討	115
3.1 本節の目的	
3.2 モデルの設定	
3.3 残留特性と微生物の不活化力に関する計算結果	
3.4 染色体異常誘発性の計算結果	
3.5 モデルを用いた消毒処理水の安全性の検討	
第4節 消毒処理水の安全性に関する総合的考察	133
第5節 結語	141
参考文献	
第7章 結論	144
付録 染色体異常誘発性に対する消毒副生成物の寄与に関する考察	149
第1節 目的	149
第2節 化学構造と染色体異常誘発性との関係の解析	150
第3節 副生成物と染色体異常誘発性との関係に関する実験	166
第4節 結語	178
参考文献	
謝辞	180

第1章 序 論

第1節 本研究の目的

自然水をそのままで飲用すれば、細菌やウイルスなどによる感染症が起こる可能性がある。これに対して浄水場では、これらの微生物の活性を失わせるために、通常塩素による消毒が行われ、その結果、我々は安心して水道の水を飲むことができる。

しかし、塩素は、微生物に作用するとともに水中の有機物とも反応する。その結果、有害な有機塩素化合物が生成し、その代表的なものがトリハロメタンである。塩素消毒をする限りこうした有機塩素化合物の生成は避けられない。

塩素消毒によって微生物的な危険性をなくすることができる反面、新たに発癌など副生成物による危険性が発生するという塩素消毒の相剋がここにある。

この問題に対し、塩素消毒方法について、代替消毒剤を導入することを含めての見直しが行われてきている^{1) 2)}。消毒のあり方についての検討は、上水処理システムの将来像と対応させて行う必要があり、その視点には種々のものが考えられる。本研究は、そのうちでも最も基本的な、消毒剤そのものの特性を比較することに焦点をあてるものである。塩素とその代替消毒剤については、これまでの研究から、その特性に関する知見が徐々に蓄積されつつある^{3) 4)}。しかし、根本的に基礎資料が不足しており、明確に判断するためにはさらに多くの基礎研究が必要である。そこで本研究は、消毒処理水の有害性と消毒効果とを同時に調べることによって、塩素とその代替消毒剤の特性を比較し、単一の消毒剤として、塩素よりも優れた消毒剤がありうるかについて検討することに目的を集中する。

つぎに本研究における視点を示してみる。まず、消毒処理水の安全性に対しては、副生成物による有害性と、微生物的な安全性との両面を評価する必要がある。また、後者の微生物的な安全性とは、消毒剤の微生物に対する不活化力と、消毒剤そのものの残留性、という2つの特性によって達成されうるものである。ここで残留性にも着目する理由は、上水は飲料水として、給水栓に至るまでは微生物に対する安全性が確保されている必要があると考えるためである。したがって、不活化力が強

くても残留性がないならば上水の単一の消毒剤として使用することはできないし、逆に残留性に優れたものであってもその不活化力が弱いならばやはり消毒剤としては不適當であると考える。以上より本研究では、消毒処理水の安全性を以下の3つの特性、すなわち、①消毒副生成物による有害性、②消毒剤の微生物に対する不活化力、③消毒剤そのものの残留性、によって評価する。消毒副生成物による有害性が低いほど、消毒剤の微生物に対する不活化力が強いほど、消毒剤そのものがよく残留するほど、消毒剤の特性としては優れていることになる。図1.1は、以上の、本研究における消毒処理水の安全性評価のための観点を示したものである。

このような視点に立ち、本研究は、塩素とその代替消毒剤の特性を比較することにより、塩素よりも優れた単一の消毒剤がありうるかについて実験的に検討することを目的とする。なお、消毒剤の特性の評価項目としては、他に、コスト、臭味、操作性などがあるが、本研究ではこれらの項目はとりあげない。

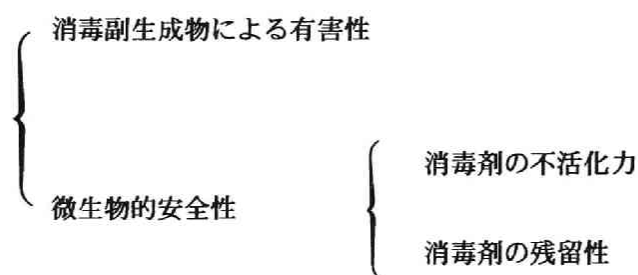


図1.1 本研究における消毒処理水の安全性に対する評価項目

第2節 本研究の構成

前節で述べた目的を達成するため、本研究では以下のような展開を行う。

本研究では、消毒処理した水中に含まれる副生成物による有害性を、その変異原性によって測定する。変異原性試験としては哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験を行う。第2章では、この染色体異常試験の結果を客観的に定量化するために画像解析を導入し、画像解析による異常染色体の検出方法を開発する。

第3章では、開発した画像解析方法を用いて、各消毒処理水の変異原性を比較検討する。

ここで変異原性とは、「遺伝子の基本構造であるDNAへ障害をもたらす性質」⁵⁾

表1. 1 主な変異原性試験の種類⁵⁾

1. 遺伝子突然変異を指標とする試験
a. 微生物(サルモネラ菌, 大腸菌など)を用いる遺伝子突然変異試験
b. 哺乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験
c. ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験
d. マウスを用いるスポットテスト
e. マウスを用いる特定座位試験
2. 染色体異常を指標とする試験
a. 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
b. げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験
c. マウスを用いる小核試験
d. げっ歯類の生殖細胞を用いる染色体異常試験
e. げっ歯類を用いる優性致死試験
f. マウスを用いる相互転座試験
g. 酵母を用いる染色体異常(異数性)試験
h. 植物を用いる染色体異常試験
3. DNA損傷を指標とする試験
a. 微生物を用いるファージ誘発試験
b. 微生物を用いるDNA修復試験(Rec-assay)
c. 哺乳類細胞を用いる不定期DNA合成(UDS)試験
d. 哺乳類細胞を用いる姉妹染色分体交換(SEC)試験
4. その他の試験
a. 酵母を用いる体細胞組換えおよび遺伝子転換試験
b. マウスを用いる精子形態異常試験
c. 哺乳類培養細胞を用いる形質転換試験

と理解されているが、この性質を検出するための変異原性試験には表1. 1に示したような種類がある。このうち、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験は、1) ヒトを含む哺乳動物細胞を試験対象とすることができる、2) 動物個体を用いる方法に比べて比較的簡便、迅速である、3) 薬物に対する感受性が高い、などの特徴を有しており、本研究ではこれを用いる。

染色体は、高等生物細胞の分裂期に観察できる。分裂期でない時期にはDNAは細胞核内に散らばっているが、分裂期が近づくと、DNA繊維や蛋白質が折りたたまれて凝縮し始め、分裂中期には最も太くかつ短縮して、塩基性色素によく染まり光学顕微鏡による形態観察に適した状態となる⁶⁾。

細胞が変異原性物質に暴露されると、染色体の構造に異常が観察されることがある。この原因としては、染色体の基本構造であるDNAに対する傷害が考えられる。DNA上の傷害は、多くは修復機構によって元に戻るが、一部は修復されなかったり誤って修復される結果、染色体の形状に変化が起きる。このことから、染色体異常は遺伝毒性や癌原性の指標のひとつになりうるものと考えられてきた。動物における

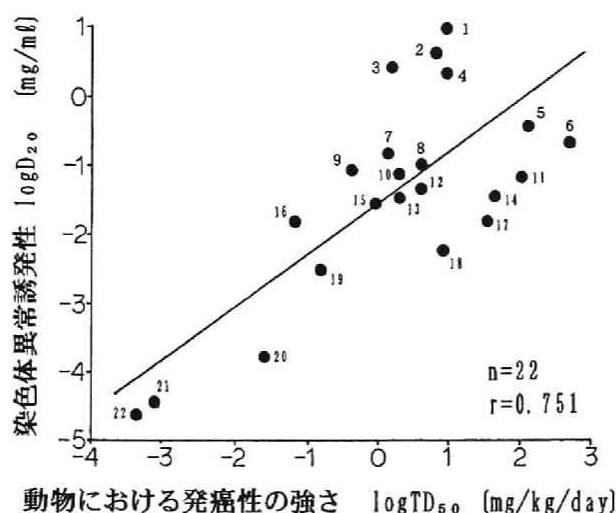


図1.2 動物における発癌性の強さ (TD₅₀) とチャイニーズ・ハムスター肺細胞 (CHL) に対する染色体異常誘発性の強さ (D₂₀) との相関性⁷⁾

TD₅₀ : 50%の個体が発癌する物質の投与量 (mg/kg/day)

D₂₀ : 細胞の20%に染色体異常が観察される物質の投与濃度 (mg/ml)

1:Urethane	2:DEN	3:Endoxan	4:Isoniazid
5:Clofibrate	6:Amaranth	7:Tris-BP	8:Acrylonitrile
9:ANU	10:DBNU	11:Malathion	12:Queroetin
13:MNU	14:2, 4-DAA	15:β-Propiolactone	16:ENUR
17:Captan	18:Furylfuramide	19:MNG	20:Thio-Tepa
21:Mitomycin C	22:Actinomycin D		

発癌性の強さと染色体異常誘発性の強さには、図1.2に示すような相関関係が得られている⁷⁾。

染色体異常試験に使用した培養細胞は、チャイニーズ・ハムスター肺細胞 (CHL) である。CHLを使用した理由は、1) 染色体が25本と少ない上、染色体が大きいので異常の観察に適していること、2) 増殖が速く実験が短期に行えること、3) 感受性が高いこと⁸⁾、などである。

第4章では、消毒剤の微生物に対する不活化特性について調べている。

現行の飲料水水質基準における微生物の項目は細菌だけであり、これでは不十分である。特に化学物質の基準項目数が飛躍的に増大しつつあるのと比較して、立ち遅れているとの指摘も強い⁹⁾。米国の飲料水水質基準における微生物の項目を表1.2に示す^{10) 11)}が、日本では依然として大腸菌群と一般細菌だけである。

飲料水の微生物的安全確保のためには、細菌学的項目に加えて、まずウイルスの項目を加える必要性が指摘されてきた¹²⁾。しかし、ウイルス試験は、広く容易に行えるとはいえず、(1) 新しいウイルス計測法の提案、(2) 指標微生物の導入などの

表1. 2 米国飲料水水質基準における微生物の項目¹⁰⁾

	Status Reg.	NIPDWR	MCLG	MCL
<i>Cryptosporidium</i>	L	—	—	—
<i>Giardia lamblia</i>	F	—	zero	TT
<i>Legionella</i>	F ^b	—	zero	TT
Standard plate count	F ^b	—	NA	TT
Total coliform	F	yes	zero	**
Turbidity	F	yes	NA	1&5NTU/PS
Viruses	F ^b	—	zero	TT

L:listed for regulation

F:final

^b:Final for systems using surface water;also being considered for regulation under groundwater disinfection rule

NIPDWR:National Interim Primary Drinking Water Regulation. Interim enforceable drinking water regulations first established under the Safe Drinking Water Act that are protective of public health to the extent feasible.

MCLG: Maximum Contaminant Level Goal. A non-enforceable concentration of a drinking water contaminant that is protective of adverse human health effects and allows an adequate margin of safety.

MCL: Maximum Contaminant Level. Maximum permissible level of a contaminant in water which is delivered to any user of a public water system.

NA:not applicable

TT: treatment technique; Treatment must achieve at least 99.9 percent removal and/or inactivation of *Giardia lamblia* cysts and 99.99 percent removal and/or inactivation of viruses.

**:No more than 5% of the sample may be positive. For systems collecting fewer than 40 samples/month, no more than 1 sample may be positive.

1&5NTU: These are two MCLs for turbidity. The monthly average MCL is 1 NTU;the two-day consecutive average MCL is 5 NTU.

提案がされている。指標微生物に関しては、細菌指標をとりいれるとの提案もあるが、大腸菌ファージが有望視されている^{13) 14)}。大腸菌ファージとは、細菌ウイルスの一種で特に大腸菌を宿主とするウイルスをさすが、形態、構造、化学組成の面で水道で問題となる腸内ウイルスと良く似ているものがあり、その検出が容易である。第4章では、大腸菌ファージをウイルス汚染の指標としてとりあげ、不活化実験に用いている。

さて、自然水中における細菌は、生菌の他に、さまざまなストレスによって正常な増殖能を失っているものがあることが知られる¹⁵⁾。また塩素処理などによってもそれが不完全な場合、すべてが死滅せず、生き残るものもある¹⁶⁾。これらの菌は、適当な環境に恵まれさえすれば、もとの正常な状態に回復し増殖することが考

えられる¹⁷⁾。これらの点を考慮し第5章では、消毒処理過程におけるこれらの菌に着目してその挙動を把握する。

第6章では、実験結果を総合し、消毒処理水の相対的安全性に関する結論を得ることを目的とする。本研究における消毒処理水の安全性に対する評価項目を示したものが図1.1であったが、このうち、消毒副生成物による有害性については第3章の染色体異常試験によって調べ、微生物的安全性のうち消毒剤の不活化力については第4章の大腸菌ファージの不活化実験によって調べている。消毒処理水の微生物的安全性を確保するもう一つの条件である、消毒剤の残留性についての実験が残されているが、これについては第6章第1節で実験的考察を行う。以上で、本研究における消毒処理水の安全性に対する評価項目についての結果が得られるので、第2節でこれらを総括することにより、消毒処理水の相対的安全性についての実験的結論を得る。しかしこの実験結果を総括した結論のうち、消毒処理水の微生物的安全性の評価については、消毒剤の不活化力と残留性の役割を定性的に考察することによってなされるにとどまる。そこで第3節では、消毒処理における反応をモデル化することにより、消毒剤の不活化力と残留性の役割について定量的な考察を可能にする。この考察は、大腸菌ファージに対する不活化力とともに、第5章で行った大腸菌の回復と再増殖を考慮して行う。しかる後、このモデルを活用して消毒処理水の安全性についての検討を行う。第4節では、以上の検討によって得られる結果を既往の研究と対比させて総合的に考察することにより、本研究の目的であった、4種の消毒処理水の安全性についての結論を得る。またこの結論のもつ限界や今後の課題点も提示する。

消毒処理水の有害性を比較するためには、本研究の染色体異常試験のようなバイオアッセイを行うことが最も望ましい。それは、種類のみならず化学物質としての特性もが多様である副生成物に対し、バイオアッセイはそれらの総括的水質指標とみなせるからである。それに対し、消毒副生成物を分析することによって、処理水の有害性を推定しようとするアプローチがあり、既往の研究では消毒処理水の有害性の比較にも利用されている。しかし本研究のように、異なる消毒剤で処理した処理水を対象とする場合、ある副生成物を分析してその有害性を比較することは大変注意深く行わなければならない。それは、各消毒剤はそれぞれ有機物との反応性が少しずつ異なるからである。現在、副生成物としては多くの場合、トリハロメタンやTOX(全有機ハロゲン化合物)がとりあげられているが、適切な指標として確立さ

れているわけではない。本研究では、消毒処理水の染色体異常誘発性に対する副生成物の寄与に関する検討を行い、これを付録として掲載する。第6章 第4節では、その結果から、副生成物の分析によって消毒処理水の有害性を比較するためにはいかなる物質に着目すべきかについて述べ、あわせてバイオアッセイを基本とした有害性の測定にその結果をいかに生かすかについて考察を行う。

第7章では、本研究での成果をまとめ結論とする。

第3節 本研究でとりあげる消毒剤とその反応性

水の消毒方法自体は、表1.3に示すように、様々な用途における要請から種々開発されている³⁾が、水道水に適用しうるものとしては、塩素、二酸化塩素、クロラミン、オゾン、紫外線に限定される場合がほとんどである¹⁹⁾。さらに本研究では、化学酸化剤による副生成物の生成を念頭に置いているので、本研究でとりあげる消毒剤は紫外線を除く上記4種とする。

ここでは、塩素、二酸化塩素、クロラミン、オゾンの各消毒剤の反応性を、本研究を展開する上で必要な事項に限定してまとめる。

3.1 塩素^{19) 20) 21)}

表1.3 水の消毒方法の種類³⁾

物理的方法	加熱，紫外線照射，γ線照射，X線照射		
化学的方法	酸化剤	ハロゲン類	塩素（液化塩素，次亜塩素酸塩，クロラミン，有機塩素剤，二酸化塩素），臭素，ヨウ素
		ハロゲン類以外	オゾン，過マンガン酸カリウム，過酸化水素
	金属		銀イオン，銅イオン，鉄酸塩
	界面活性剤		逆性石鹼
	酸，塩基		強酸，強アルカリ
	イオン交換体		イオン交換樹脂，イオン交換膜

塩素 Cl_2 は、水に溶解すると加水分解によって HOCl (次亜塩素酸) となるが、さらにその一部が解離して OCl^- (次亜塩素酸イオン) が生成する。これらの反応は次式で表される。



したがって、水中での塩素の主な化学形は HOCl 、 OCl^- 、 Cl_2 、 Cl^- であるが、それぞれの存在量の比率は pH に依存する。このうち Cl^- には酸化力や殺菌効果はなく、無効化したといわれる。他の3種について、存在比の pH 依存性を示したものが図1.3である。通常の水処理の範囲である中性付近では、 HOCl と OCl^- が共存している。重要な点は、 HOCl と OCl^- とでは、その酸化力、殺菌力が著しく異なることである。酸化剤の酸化力を示す標準電極電位を表1.4に示すが、 OCl^- よりも HOCl の方が値が大きい。殺菌力では、 OCl^- の殺菌力は HOCl の数十分の1にすぎないといわれる。したがって、塩素の酸化力、殺菌力は pH に大きく依存する。

なお、塩素剤として次亜塩素酸ナトリウムを使用することがあるが、この場合も次式のように水中で水と反応して次亜塩素酸が生成する。



HOCl の反応は、求電子反応であるが、有機物はこれによって塩素化あるいは酸化

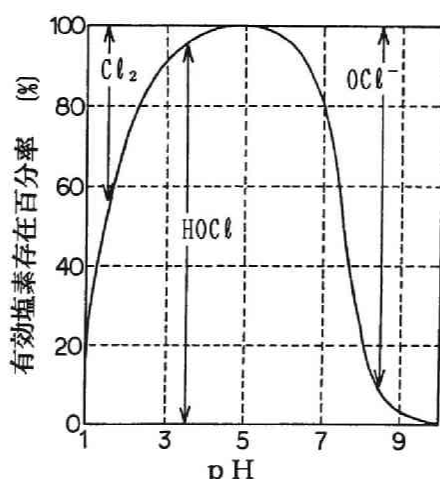


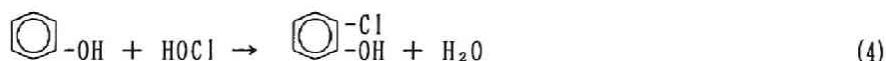
図1.3 遊離有効塩素の存在比²⁰⁾

表 1. 4 酸化剤の標準電極電位²⁰⁾

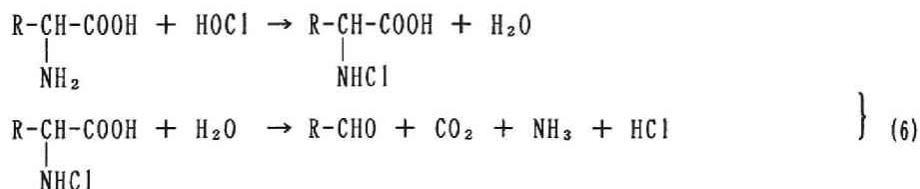
標準電極電位の値が大きいことは、その反応が起きやすい（還元されやすい）、すなわち他の物質を酸化しやすいことを表す。

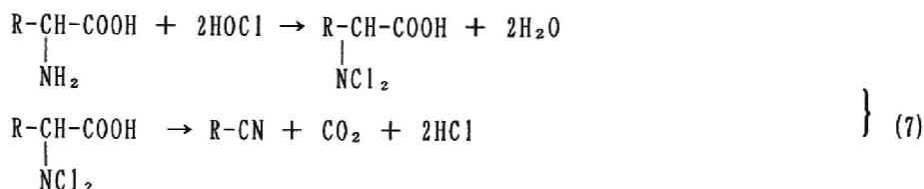
酸化剤	反応式	E°, V
塩素	$\text{Cl}_2 (\text{g}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cl}^-$	1. 36
次亜塩素酸	$\text{HOCl} + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$	1. 49
次亜塩素酸イオン	$\text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^- + 2\text{OH}^-$	0. 90
クロラミン		
モノクロラミン (酸性)	$\text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$	0. 75
ジクロラミン (酸性)	$\text{NHC l}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cl}^- + \text{NH}_3 + 2\text{OH}^-$	0. 79
モノクロラミン (塩基性)	$\text{NH}_2\text{Cl}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{NH}_4^+$	1. 40
ジクロラミン (塩基性)	$\text{NHC l}_2 + 3\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cl}^- + \text{NH}_4^+$	1. 34
オゾン (酸性)	$\text{O}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	2. 07
オゾン (塩基性)	$\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{OH}^-$	1. 24
過酸化水素 (酸性)	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	1. 78
過酸化水素 (塩基性)	$\text{HO}_2^- + 2\text{e}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{OH}^-$	0. 85
二酸化塩素	$\text{ClO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 5\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^- + 4\text{OH}^-$	1. 71
亜塩素酸イオン	$\text{ClO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^- + 4\text{OH}^-$	0. 76
塩素酸イオン	$\text{ClO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ClO}_2^- + 2\text{OH}^-$	0. 35
過マンガン酸塩 (酸性)	$\text{MnO}_4^- + 4\text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightarrow \text{MnO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	1. 68
	$\text{MnO}_4^- + 8\text{H}^+ + 5\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O}$	1. 49
過マンガン酸塩 (塩基性)	$\text{MnO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O} + 3\text{e}^- \rightarrow \text{MnO}_2 + 4\text{OH}^-$	0. 58
酸素 (酸性)	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	1. 23
酸素 (塩基性)	$\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$	0. 40

反応を受ける。塩素化反応と酸化反応とは厳密にはいずれも酸化反応であるが、本研究では、有機塩素化合物の有害性と塩素を含まない副生成物の有害性との両面をとりあげるためこれらを区別する。まず塩素化反応の例を示す。



一方、塩素の求電子反応によって生成した塩素化合物から、脱塩酸 (HCl の脱離) が起これば、これは酸化反応であり、クロラミンが N_2 に分解される反応 (いわゆる不連続点反応) や、アミノ酸に塩素が作用した結果脱炭酸や脱アミノによってアルデヒドやニトリルを生成する反応は、塩素化反応の結果起こる酸化反応である。





したがって、塩素と有機物との反応では、有機塩素化合物の生成とともに、塩素を含まない化合物も生成している点に注意しておく必要がある。

水中の有機物とハロゲンとの反応によるトリハロメタンの形成は古くからハロホルム反応として知られている。これは、メチルケトン基を有する化合物とハロゲンが水中で反応してハロホルム（クロロホルム、プロモホルム、ヨードホルム）を生成する反応である。メチルケトン基そのものでなくても、塩素などにより酸化されメチルケトン基を生成する化合物はすべてハロホルム反応の前駆物質となりうる。

図1.4は、アセチルアセトン为例にとり、ハロホルム反応によるクロロホルム生成経路を示したものである。注意すべき点は、クロロホルムを生成するまでに2回の加水分解を経由するが、これは水酸イオンが触媒することである。すなわちアルカリ性になるほど加水分解速度は大きくなり、クロロホルムの生成速度も増大する。同じことは、自然水中有機物との反応においてもいえる。例えば、塩素処理水中のトリハロメタン中間体の測定においては、処理水のpHを上げて、生成してくるトリハロメタン量を測定する方法がとられる²²⁾。これはアルカリ条件下では、加水分解反応が促進し、トリハロメタン生成が促進することを利用したものである。

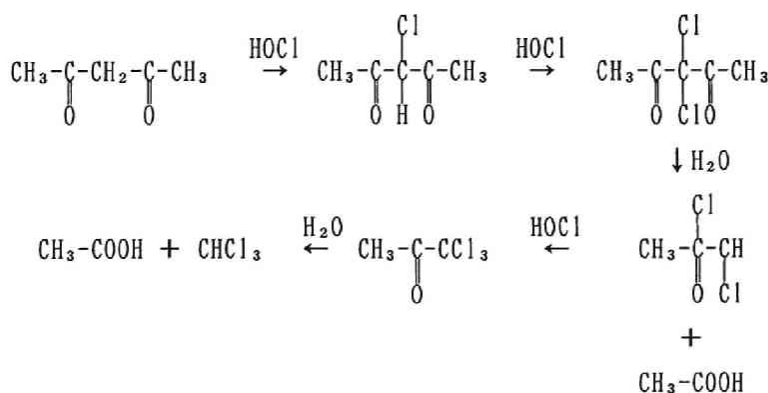
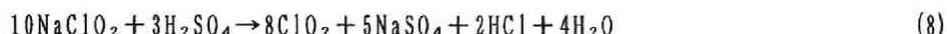


図1.4 アセチルアセトンのハロホルム反応によるクロロホルム生成経路²¹⁾

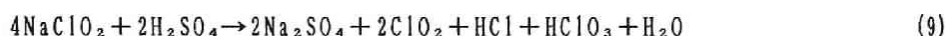
3. 2 二酸化塩素^{19) 21)}

二酸化塩素 ClO_2 は、濃緑色で爆発性のあるガス体で、 Cl_2 ガスよりも刺激性が強く、吸入による毒性も強い。二酸化塩素の発生法は、大別すると以下になる。

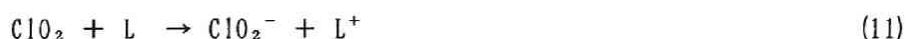
①塩素酸塩を還元剤で還元する方法、②塩素酸塩を電解還元する方法、③亜塩素酸塩を酸化剤で酸化する方法、④亜塩素酸塩を陽極酸化する方法。実験室的には③の方法が用いられ、本研究でも、次式の反応で二酸化塩素を発生させた。



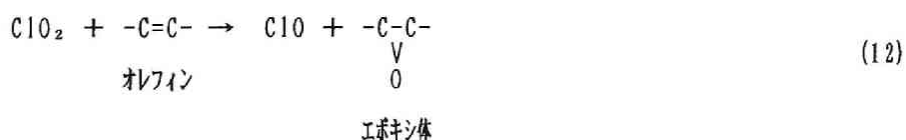
または



ClO_2 の化学反応性が Cl_2 と最も異なる点は、 Cl_2 が水と反応して HOCl になるのに対し、 ClO_2 はそのまま水溶液中に存在することである。したがって、 ClO_2 水溶液の反応性は ClO_2 分子の反応性を表す。表1.4中では ClO_2 は5当量の酸化剤として働くことが示されているが、これは水溶液中の ClO_2 を酸性ヨウ素法で定量する場合などにおける反応である。有機化合物との反応においては ClO_2 は一般に1当量の反応を起こし、 ClO_2 は亜塩素酸イオン ClO_2^- となり、この形で水中に残留する。



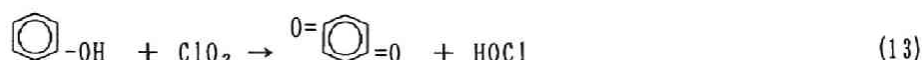
Lは有機物を表す。また、オレフィン類の不飽和基に酸素付加してエポキシ体を生成する反応では、2当量の反応を起こし、 ClO_2 は一酸化塩素 ClO となる。



式(10) (11) (12)の反応は、いずれも塩素化を伴わない酸化反応である。これらの反応はpH依存性がなく、反応の種類、生成物も塩素の反応とはまったく異なる。

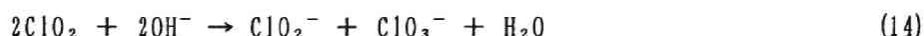
フミン質や自然水を二酸化塩素で処理したときの副生成物としてよく検出されるのは、アルデヒド類やカルボン酸類である²³⁾。一方、有機物と二酸化塩素との反応においても少量の有機塩素化合物が生成する。自然水を二酸化塩素処理したときに生成するTOX量は塩素処理時の5分の1から20分の1であるともいわれる。こうした有機塩素化合物が生成するのは、 ClO_2 との直接反応ではなく、反応の進行に伴って遊離してくる HOCl と2次的に反応したものであらうと考えられている。例え

ば、フェノールと ClO_2 との反応においては、次式のような HOCl を遊離する反応が起きる。



したがって、二酸化塩素処理水中の副生成物の多くは塩素を含まない酸化物であるが、少量の有機塩素化合物も含まれる。

また、二酸化塩素処理においては、無機副生成物の生成が問題にされる。 ClO_2 と有機物とが反応すると、式(10)(11)で示されるように亜塩素酸イオン ClO_2^- が生成する。また極端な例であるが、 ClO_2 水溶液が強アルカリ性(pH11~12)であると、 ClO_2 の不均化反応が起こり、亜塩素酸イオンと塩素酸イオンが生成する。



したがってこのような領域では、有機物との反応性も低下する。酸性領域でも、 ClO_2 により ClO_2 が ClO_3^- に酸化されるために ClO_2 の損失がある。このほか種々の相互反応や不均化により、 ClO_2 の再生があったり ClO_3^- の生成が起こったりするという。そこで ClO_2 処理の結果、必然的に ClO_2^- 、 ClO_3^- が残留することになる。EPAのパイロットプラントでオハイオ川の水に1.5mg/lの二酸化塩素を加えた実験では、二酸化塩素の約50%は亜塩素酸塩に、約25%は塩素酸塩、そして約5%は塩化物に変化したという¹⁸⁾。また小沢ら²⁴⁾が利根川の水を二酸化塩素処理した結果では、主たる無機副生成物は ClO_2^- で、 ClO_3^- はその1/5以下であり、ほとんど生成しない例もあった。

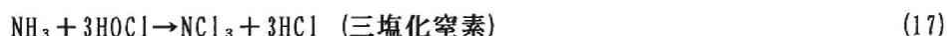
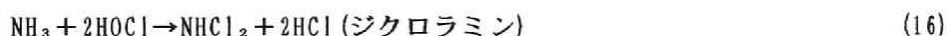
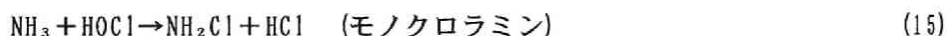
無機副生成物は他の消毒剤でも生成するが、特に二酸化塩素処理において問題にされる理由は、 ClO_2^- と ClO_3^- の毒性が強いためである。最もよく指摘される毒性は、血液中のヘモグロビンと化合してメトヘモグロビン症を起こす性質である。一般毒性試験から、NRC(National Research Council)が勧告した、有害作用を示さない濃度をモノクロアミン、二酸化塩素と比較して表1.5に示す²⁵⁾が、 ClO_2^- と ClO_3^- の毒性が特に強いことがわかる。そこでU. S. EPAでは、飲料水中の ClO_2 、 ClO_2^- 、 ClO_3^- の残留量の合計を0.5mg/l以下に制限することを提唱している¹⁸⁾。

3. 3 クロラミン^{19) 20) 21)}

アンモニアと次亜塩素酸を共存させれば、次式のようにクロラミンが生成する。

表1.5 消毒剤とその無機副生成物に関する
有害作用を示さない濃度の勧告値²⁵⁾
(suggested no-adverse-effect level, SNARL)

	70kgの大人	10kgの子供
NH_2Cl	581 $\mu\text{g}/\ell$	166 $\mu\text{g}/\ell$
ClO_2	210 $\mu\text{g}/\ell$	60 $\mu\text{g}/\ell$
ClO_2^- ClO_3^-	24 $\mu\text{g}/\ell$	7 $\mu\text{g}/\ell$



しかし、これらの塩素化反応は、ここに示したそれぞれのモル比でアンモニアと次亜塩素酸とを混和したときにだけ起こるわけではなく、生成物の組成はpHによって左右される。モノクロラミンとジクロラミンの平衡関係については、次式が提示されている。

$$\frac{(\text{NH}_4^+) (\text{NHC}_2\text{H}_4)}{(\text{H}^+) (\text{NH}_2\text{Cl})} = 6.7 \times 10^5 = K_{eq} \quad (18)$$

またこの関係を図示したものが図1.5である。本研究では、クロラミンによる反応とはモノクロラミンを想定している。すなわち、アンモニアと次亜塩素酸とをpH10

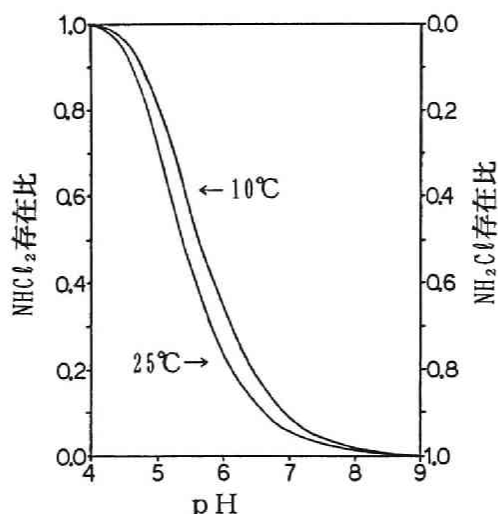


図1.5 モノクロラミンとジクロラミンの存在比
(水中で塩素とアンモニアを等モル反応させた場合)

で反応させてモノクロラミン液を作製し、これを有機物との反応、微生物の不活化実験に用いた。しかし、クロラミン処理中は、一般にはより低いpH条件となるため、モノクロラミンは、



なる不均化反応を起こして、ジクロラミンとアンミニアに転化し始め、式(18)の平衡関係へ向かう。したがって、例えば中性付近では純粹のモノクロラミンと、有機物または微生物とを反応させることはできない。しかし、式(19)の反応速度は、 $80 \exp(-2160/T)$ (単位 $\text{l/mol} \cdot \text{sec}$, T は絶対温度) と遅く、平衡に達するのに1日程度を要するため、実際には、モノクロラミンとの反応とみなせる場合が多い。

クロラミンを使用した場合、フミン質のようなトリハロメタン前駆物質からのクロロホルム生成は、塩素の場合よりも著しく減少する。その理由は、クロラミンの塩素化反応の活性が弱いために十分な塩素化中間体が生成しないためと考えられる。しかし表1.4に示すようにクロラミンにも一定の酸化力があるので、生成物の種類は塩素の場合と同様に、塩素付加物、塩素置換物、酸化物などの他、アミノ化物なども生成する²⁶⁾。

また、クロラミン処理の場合にも二酸化塩素処理と同様に、共存する塩素が反応に関与している可能性が指摘されることがある。実際、モノクロラミンは水中で次式のように加水分解反応を起こしてHOClを生成する。



しかし、この反応の平衡定数は $K=6.7 \times 10^{-12}$ であり、共存するHOClは微量であると考えてよい。

3.4 オゾン

Staehelinら²⁷⁾ は水中におけるオゾンの反応性について詳細に研究し、溶質が存在する場合の反応モデルとして図1.6を提示している。ここでは O_3 による直接反応⑤と O_3 が分解して生成したOHラジカルによる間接反応⑧の2種類が示されている。間接反応の場合、 O_3 は水酸イオンと反応してOHラジカルとなった後、溶質はこれと反応する。したがって反応速度はpHに依存する。また、物質によってはOHラジカルと反応した後反応を停止するものがある。このとき溶質Mは図の反応鎖を抑制する働きをし、スカベンジャー (scavenger) と呼ばれる。さらに水中に Fe^{2+} や Mn^{2+} など

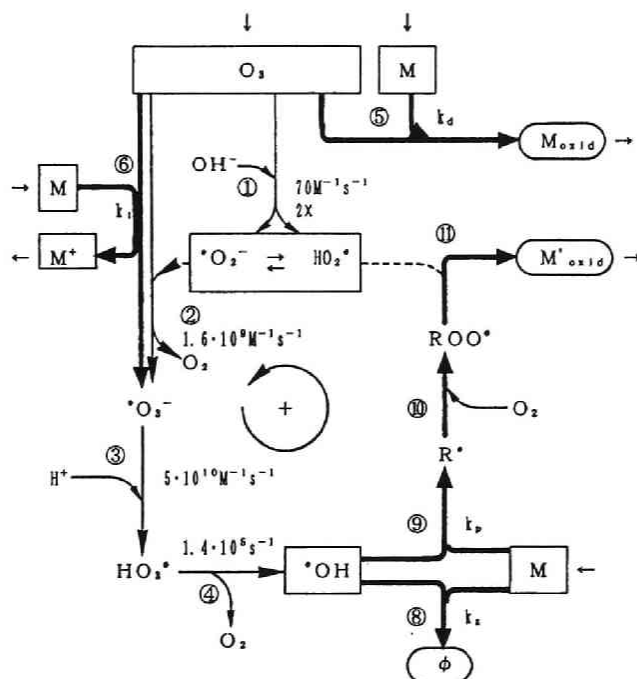


図1. 6 溶質(M)が存在する場合のオゾン反応²⁷⁾

⑤直接反応

⑨ラジカル反応。このときMは反応鎖を促進するPromoterとして働く。

⑧物質によってはOHラジカルと反応した後新たな反応を起こさないものがある。このときMは反応鎖を抑制するScavengerとして働く。

⑥Mが還元性溶質の場合OHラジカルを生成させる働きをする。Initiatorとよばれる。

の還元性物質が存在すれば、これらは O_3 と反応してOHラジカルを生成する働きをし、イニシエーター (initiator) と呼ばれる。OHラジカルは O_3 分子よりも酸化還元電位が高く、反応性が高い。そこでOHラジカル反応を利用するために、(1) 高pH域での処理、(2) 過酸化水素添加、(3) 紫外線照射、(4) 超音波併用、(5) 電解法併用などの方法が開発されている²⁸⁾。

フミン質や水道原水をオゾン処理した場合の副生成物として共通しているのは、飽和脂肪酸類、およびアルデヒド類やケトン類のようなカルボニル化合物などである²⁹⁾。

参考文献

- 1) Likins, B. W., Moser, R., and DeMarco, J., Treatment Technology in The United States: Disinfection and Control of Disinfection By-products, The 2nd Japan-U. S. Governmental Conference on Drinking Water Quality Management, US-4, 1990
- 2) Regli, S., Means, E. G., and Lykins, B. W., Disinfection and Disinfection By-products Regulation in The United States, The 3rd U. S.-Japan Governmental Conference on Drinking Water Quality Management, 1992
- 3) 金子光美, 水の消毒の動向, 用水と廃水, Vol. 32, No. 4, pp. 3-7, 1990
- 4) 日本水道協会工務部, 水道における二酸化塩素の適正使用方法に関する基礎的研究, 平成3年度研究報告書, 1992
- 5) 祖父尼俊雄, 変異原性試験, 水道協会雑誌, 第60巻第5号, pp. 24-34, 1991
- 6) 小泉明, 日暮眞編, 環境細胞遺伝学序説, 医歯薬出版, 1979
- 7) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, 化学物質による染色体異常アトラス, 朝倉書店, 1988
- 8) 牧野佐二郎他編, 放射線・化学物質と染色体異常, 医学書院, 1982
- 9) 金子光美, 水質保全と微生物指標, 水質汚濁研究, Vol. 13, No. 8, pp. 2-8, 1990
- 10) DRINKING WATER REGULATIONS AND HEALTH ADVISORIES by Office of Drinking Water, U. S. Environmental Protection Agency, April 1990
- 11) FACT SHEET Drinking Water Regulations under the Safe Drinking Water Act, Criteria and Standards Division, Office of Drinking Water, U. S. Environmental Protection Agency, May 1990
- 12) 萩原耕一編著, 水質衛生学, 光生館, 1985
- 13) IAWPRC Study Group on Water Virology, The Health Significance of Viruses in Water, Water Research, Vol. 17, pp. 121-132, 1983
- 14) IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, Bacteriophages as Model Viruses in Water Quality Control, Water Research, Vol. 25, pp. 529-545, 1991
- 15) Andrew, M. H. E. and Russell, A. D., eds., The Revival of Injured Microbes, Academic Press, London, 1984
- 16) McFeters, G. A., Kippin, J. S., and LeChevallier, M. W., Injured Coliforms in Drinking Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 51, No. 1,

pp. 1-5, 1986

17) 春田三佐夫他編, 最新食品微生物制御システムデータ集, サイエンスフォーラム, 1983

18) 米国環境保護庁編, 真柄泰基監訳, 飲料水とトリハロメタン, 技報堂, 1983

19) White, G. C., The Handbook of Chlorination, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1986

20) American Water Works Association, Water Quality and Treatment, McGraw-Hill, New York, 1990

21) 丹保憲仁編著, 水道とトリハロメタン, 技報堂出版, 1983

22) 梶野勝司, 水道における有機塩素化合物の生成過程とその制御に関する研究, 北海道大学学位論文, 1981

23) Rav-Acha, C., The Reactions of Chlorine Dioxide With Aquatic Organic Materials And Their Health Effects, Water Research, Vol. 18, No. 11, pp. 1329-1341, 1984

24) 小沢茂, 相沢貴子, 富沢恒夫, 斉藤実, 真柄泰基, 二酸化塩素処理の反応生成物に関する検討, 水道協会雑誌, 第60巻第4号, pp. 10-18, 1991

25) Subcommittee on Disinfectants and Disinfectant By-Products, Commission on Life Sciences, National Research Council: Drinking Water and Health, Disinfectants and Disinfectant By-Products, Vol. 7, National Academy Press, Washington, D. C., 1987

26) Safe Drinking Water Committee, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Assembly of Life Sciences, National Research Council, Drinking Water and Health, Vol. 2, National Academy Press, Washington, D. C., 1980

27) Staehelin, J. and Hoigne, J., Decomposition of Ozone in Water in the Presence of Organic Solutes Acting as Promoters and Inhibitors of Radical Reactions, Environmental Science and Technology, Vol. 19, No. 12, pp. 1206-1213, 1985

28) 宗宮功編著, オゾン利用水処理技術, 公害対策技術同友会, 1989

29) 永瀬久光, 水中有機物のオゾン処理生成物とその変異原性, 水質汚濁研究, Vol. 13, No. 12, pp. 13-21, 1990

第2章 画像解析による異常染色体検出法の開発

第1節 画像解析の意義

染色体異常試験では最終的に検鏡によって染色体を観察し異常を判定する必要がある。しかし、その判定基準、記録の方法などが、特に経験の浅い実験者の場合統一的であるとはいえず、実験者によって報告結果に差がある可能性がある。また染色体の分析には相当の時間と熟練を要する。そのため染色体像を画像解析することによって異常を検出し、試験結果を客観的に評価しかつ高速に処理することが求められる。

染色体の画像処理自体は、1960年代から試みられてきた^{1) 2)}。目的とされたもののひとつは染色体数の計数、核型分類³⁾である。これは主として先天性の染色体異常疾患を検査するためのものである。他のひとつは、放射線によって生成する染色体異常を検出しようとするものである^{4) 5)}。放射線の場合は、化学物質と異なり、環状染色体と二動原体染色体を検査対象とすればよく、その識別方法が詳細に検討された。一方、化学物質によって生成する異常染色体の画像解析例はほとんど見当たらない。本研究では、市販のパソコンタイプの画像処理装置を使用し、化学物質によって生成する異常染色体の識別を試みる。

また本研究は、最終的に消毒処理水の変異原性を比較するのが目的であるため、本章では、試料の変異原性の強さの相対的な比較が可能となる精度を有した画像解析法を開発するのが目的となる。

第2節 画像解析方法構築上の方針

(1) 染色体構造異常の種類⁶⁾

本研究では染色体異常試験はチャイニーズ・ハムスター肺細胞（CHL）を用いて行う。写真2.1にCHLの正常な染色体像を示す。

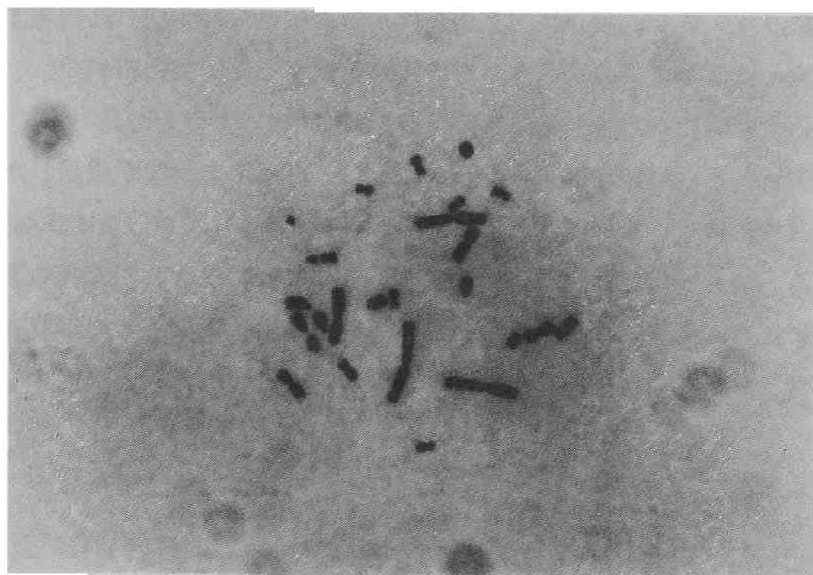
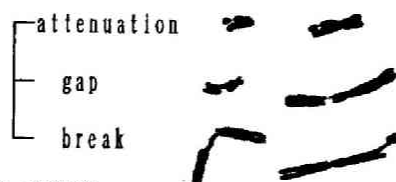


写真2.1 CHLの正常染色体像

1. 切断型



2. 交換型



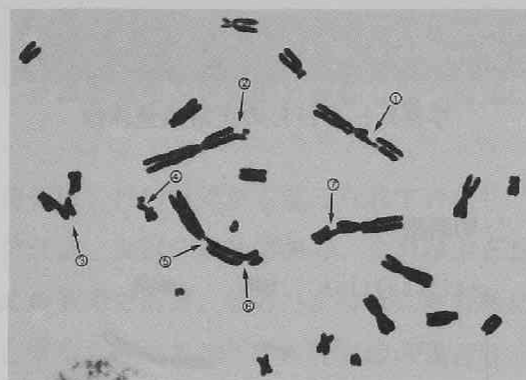
図2.1 染色体異常の典型例⁶⁾

化学物質を与えたときに生成する染色体異常は、切断型と交換型に大別することができる。さらにそれぞれを細分し、その典型例を示したものが図2.1である。図中、attenuation（やせ細り）は、構造異常には含まないのが普通であるが、画像解析では切断型と同等に扱える場合が少なくないことから、本解析では切断型の一

種として扱った。また、染色体内交換とは1本の染色体に生成した異常であり、染色体間交換とは2本以上の染色体から異常が生成するものである。

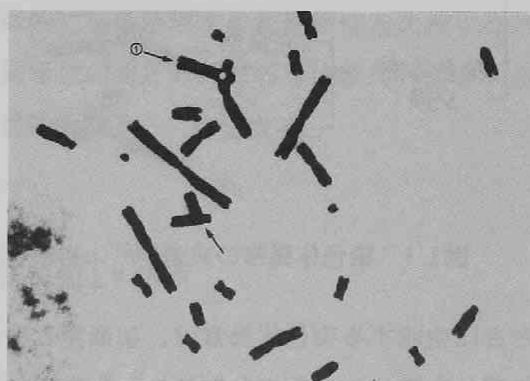
(2) 「化学物質による染色体異常アトラス」について

「化学物質による染色体異常アトラス」⁶⁾は、多くの専門家が提供した染色体異常の写真資料に対し、異常箇所の指摘とその分類を図2.1よりさらに詳細に行ったものである。例を写真2.2, 写真2.3に示す。この資料に示された写真の多くは、チャイニーズ・ハムスター株細胞についてのものである。以下、この写真資料中の染色体を異常アトラス染色体と称して、第4節に述べる実際標本と区別することにする。



①②④⑥break, ⑤⑦gap,
③染色体間交換不完全型

写真2.2 異常アトラス染色体の例⁶⁾



①染色体間交換完全型
番号なし矢印は染色体の重なり

写真2.3 異常アトラス染色体の例⁶⁾

本資料は日本環境変異原学会が染色体異常の標準的判定方法を集大成したものであるので、本資料を直接画像解析に供し、これに対する識別方法を呈示することができれば、同じ識別方法を適用することにより、実際標本の異常染色体の定量化が可能になる。この方針によれば、自ら作製した染色体標本を解析対象としないため、染色体異常の判定に関して熟練する必要がない点が重要であって、開発する識別方法は高い客観性を有することになる。

第3節 異常アトラス染色体の画像解析

(1) 画像処理の概要

画像処理装置概要を図2.2に示す。実際に作製するCHLの染色体標本は、顕微鏡画像として入力するが、これは第4節の実験で行う。一方、本節で画像解析する異常アトラス染色体の写真は、10.2cm×14.4cmの大きさであり、この像の入力にあたってはマクロ撮影装置を用いた。

図形の定量化のためには、入力信号に対し、あるレベル（しきい値）より信号が大きいき1，小さいとき0とする2値化を行う⁷⁾。その後、重なり染色体や異物の除去、接触部分の切り離し、同時に2値化された矢印の除去等をディスプレイ上でマニュアル操作により行う。

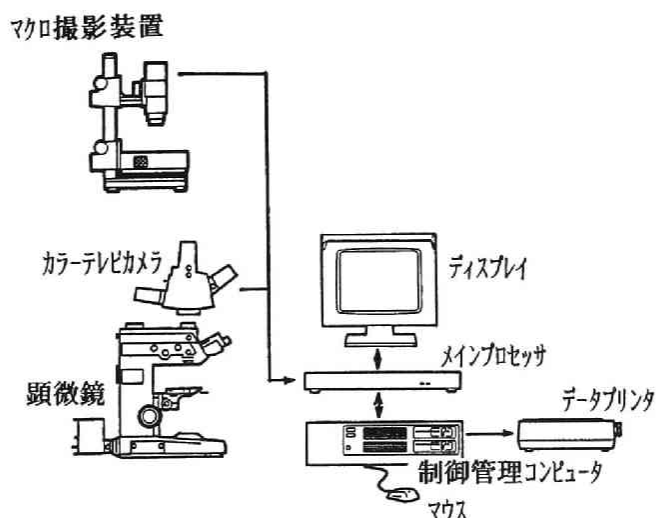


図2.2 画像処理システム

(2) 解析対象染色体の選択

本アトラスには多くの専門家が写真を提供しているため、染色体標本のでき方が微妙に異なっている。図2.3に示すように、主要な相違点是一对の染色体の開き具合である。その結果全ての染色体を解析対象とすると、正常染色体自体の形状に違いがあるため、識別上困難が伴うことがわかった。そこで、後に異常の識別を行うべき自製の染色体標本を基準として、正常染色体の形状が同じと考えられる写真を選択することにした。ちなみに筆者の作製している染色体標本は基本的に染色体の開きは小さいかほとんど見られないものである。選択にあたってのパラメータとしては、開き具合を鋭敏に測ることができるPM/CPM (PM:周囲長, CPM:包絡周囲長,

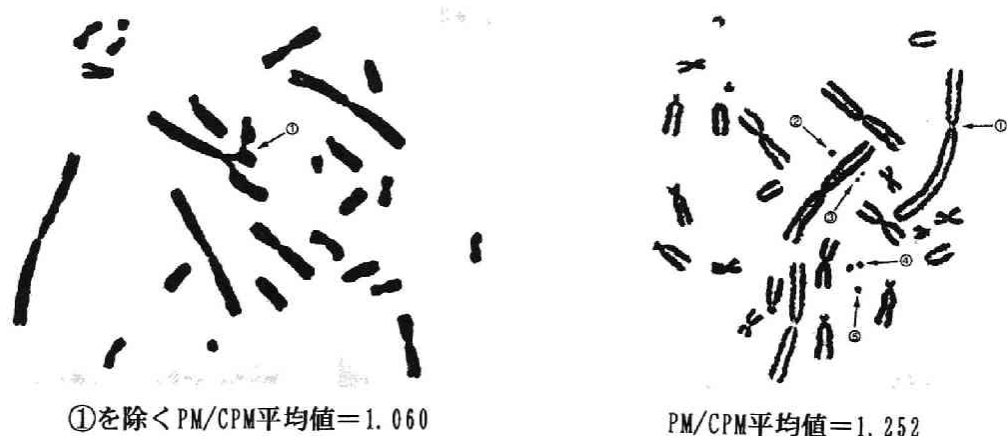


図2.3 異常アトラスにおける染色体標本のでき方の違い⁶⁾

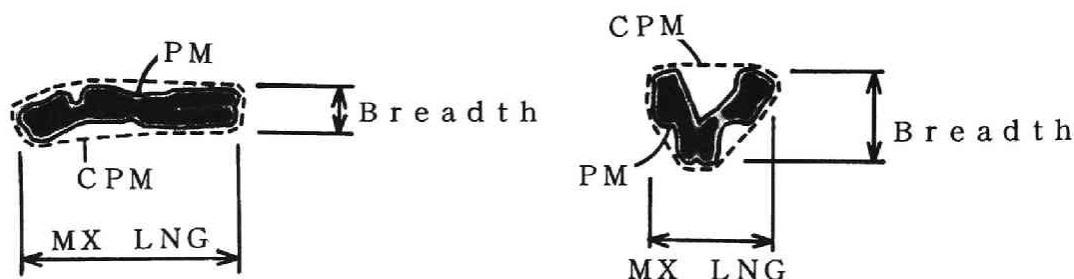


図2.4 パラメータの定義

図2.4参照)とした。PM/CPMは図形の凹凸を表す形状係数で、周囲形状が複雑なものほど大きな値となるものである。

正常染色体標本は継代後2日目に作製した。その他は第4節に述べる方法と同じである。1本の培養瓶から1標本作製し、計34標本作製した。各標本から任意の1染色体像(染色体数25本)のPM/CPM値を計測し、その平均値(45°以上の曲り染色体を除く)のヒストグラムを示したものが図2.5である。危険率5%, χ^2 検定によって正規分布性を確認した後、95%存在域を求めると $1.0542 < \text{PM/CPM平均値} < 1.0722$ となる。同様に異常アトラス染色体中の正常染色体(45°以上の曲り染色体も除く)のPM/CPM平均値を求めた。図2.3中に示したように、染色体の開き具合が異なるとPM/CPMの値は大きく異なる。異常アトラス染色体中の正常染色体のPM/CPM平均値のヒストグラムを図2.6に示す。図2.5と比較して値の大きなものが存在していることがわかるが、この違いは染色体の開き具合に由来するものである。PM/CPM平均値が上の範囲にある異常アトラス染色体は、62標本中、35標本であった。この35標本について異常の種類と数をまとめて示したものが表2.1である。

(3) 異常識別方法と結果

(A) 異常形状の考察

染色体像の形状解析において使用したパラメータの定義を図2.4に示す。PM(perimeter)は画像の周囲長を表す。CPM(convex perimeter)は包絡周囲長とよばれ、画

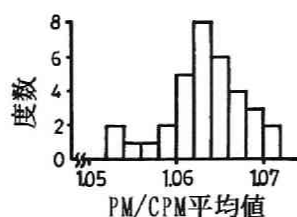


図2.5 自製正常染色体
PM/CPM平均値分布

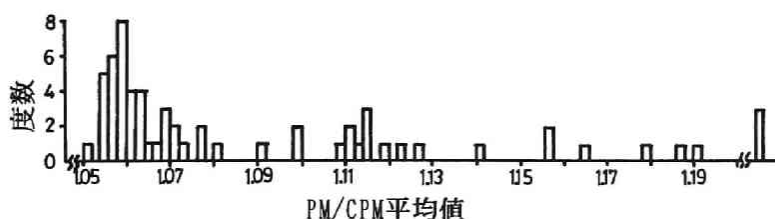


図2.6 異常アトラス染色体中の正常染色体のPM/CPM平均値分布

表2. 1 解析対象異常アトラス染色体の異常分類



No	正常染色体数 (曲り含む)	異常のない45°以上曲り	切断型			染色体内交換		染色体間交換		他	総数
			atten- uation	gap	break	完全 型	不完 全型	完全 型	不完 全型		
1	20	1	2	1							23
2	17		1 (1)	2	4 (1)						24
3	20		1	2	1						24
4	21					1					22
5	21	2				1					22
6	20	1				1		1			22
7	23	1		1		1					25
8	15				3	1			1		20
9	23	3				1					24
10	20	2				2					22
11	22	1				1					23
12	20					1					21
13	22							1			23
14	19	1						1			20
15	22							1			23
16	24								1		25
17	19	1							1		20
18	14			1	4 (1)				1		20
19	21	1						1			22
20	22	1			1			1			24
21	14							2	1		17
22	15	4		1					1		17
23	23		1		1	1					26
24	18					1			1		20
25	20				1			1			22
26	14	1						1	1		16
27	18	1				1		2			21
28	21						1				22
29	20					1				1	22
30	16	3						1	3	1	21
31	21	2	1 (1)							1	23
32	28	1							1	1	30
33	47	1						1			48
34	18		6 (1)								24
35	21	1	3								24
合計	719	29	15 (3)	8	15 (2)	14	1	14	12	4	802
			38 (5)			45					

() は曲りを含むもの

像の周囲長を凹部が生じないように測定するものである。また、画像を2本の平行線で挟み込んだときの平行線間距離の最小値が幅Breadth (BD) であり、最大値が絶対最大長MX LNG (ML) である。染色体の1本1本についてこれらのパラメータを測定し、それらを組み合わせることによって染色体形状を特徴付け、その染色体が正常であるか異常であるかを識別することを試みる。これらのパラメータの他、染色体像の面積や、画像のなかに穴がある場合にはその面積を測定し、識別に用いた。

形状解析にあたり、各異常形状の簡単な考察を行う(表2.2参照)。切断型においては、まず欠落した部分だけ周囲長が増大し形状が複雑になるので、PM/CPM(周囲長/包絡周囲長)値は僅かに増大する。しかし染色体の一部が欠落しているだけ

表2.2 異常形状の考察

		PM/CPM 周囲長/ 包絡周囲長	BD/ML 幅/ 絶対最大長
切断型		増大	不変
交換型		増大	増大

なので、染色体の大略的形状に変化はなく、BD/ML（幅／絶対最大長）値は不変であると考えられる。一方、交換型では、形状が大きく変化し複雑になっているものが多いので、PM/CPM値、BD/ML値ともに増大すると考えられる。また図のように、構造によっては2値化したとき穴が検出されるものがあり、この場合染色体画像内の穴の面積が正となる。

以上の考察により、最初にパラメータPM/CPMによって切断型異常、交換型異常をもつ染色体を正常染色体から識別することを試みる。しかる後、パラメータBD/MLにより切断型異常と交換型異常とを区別することを試みる。

(B) PM/CPMによる識別

表2.1の35標本、計802本の染色体に対し、その1本1本について、PM/CPM値と画像面積Areaを測定した。図2.7は、PM/CPM値をAreaに対してプロットしたものであり、Areaの単位は画素数 [pt] である。

(A)で考察したように、切断型異常、交換型異常をもつ染色体は、PM/CPM値が増大する結果、正常染色体の分布域から外れ、図の上方に分布していることがわかる。識別曲線は、異常の見落とし率が小さくかつ正常の見誤り率が小さくなるように設定した。その結果、交換型、切断型異常の見落とし率はそれぞれ 4.5%、36.1%、正常の見誤り率は1.88%となっている。識別曲線を図の位置より全体的に上昇させた場合、正常の見誤り率が低下しないわりに異常の見落とし率が増大し、逆に下降させると異常の見落とし率が低下しないわりに正常の見誤り率が増大する。

一方、図2.8に示すように、パラメータPM/CPMの性質により、曲り染色体も識別

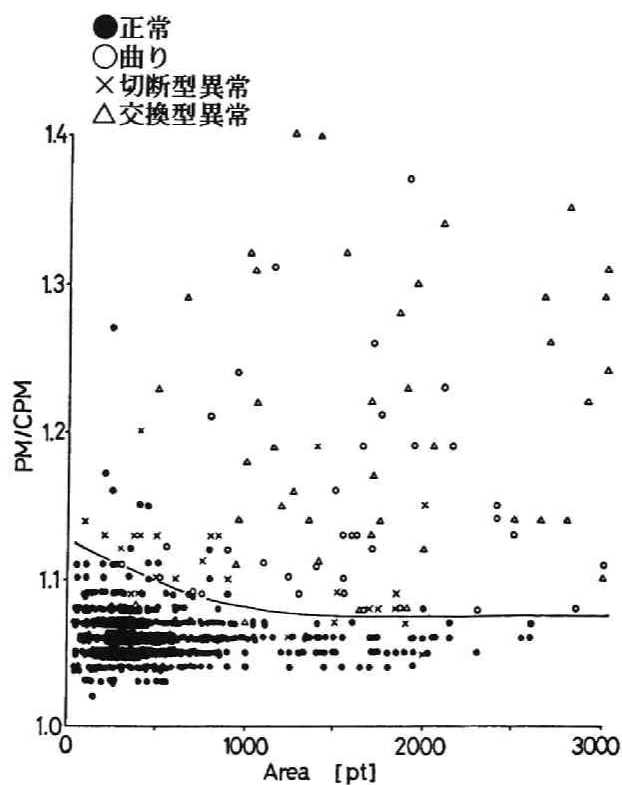


図2.7 異常アトラス染色体の全プロット (n=802)

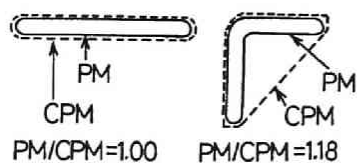


図2.8 曲り染色体とPM/CPM値

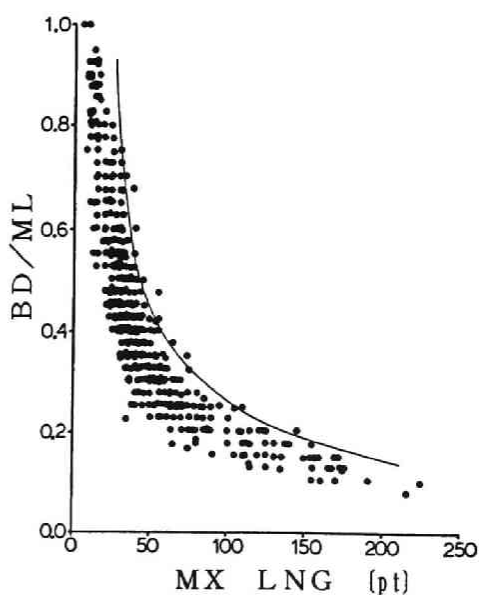


図2.9 正常染色体の分布

曲線の上方に混在している。曲り角度が大きくなるほどPM/CPM値も大きくなる。識別曲線付近の曲り角度は約 45° であり、今後曲り染色体という場合、この識別曲線で抽出される曲り角度 45° 以上の染色体をさす。

図2.7における識別状況をつぎにまとめる。

- ① 交換型の95.5%が抽出可能である。
- ② 切断型の抽出率は63.9%である。
- ③ 曲り染色体も抽出されている。

つぎの識別段階では、識別曲線より上方に分布する染色体を対象として、切断型異常と交換型異常とを識別するが、同時に曲り染色体を除去する過程を含む必要がある。

(C) 切断型の識別

(A)の考察により、図2.7で抽出された染色体のうち、BD/ML値が正常域に存在するものを切断型とする。図2.9は正常染色体（曲り染色体を除く）をBD/ML～MX LNG平面上にプロットしたものである。一方、図2.10は、切断型異常染色体のうち図2.7で抽出されたものをBD/ML～MX LNG平面上にプロットしたものである。図2.9、

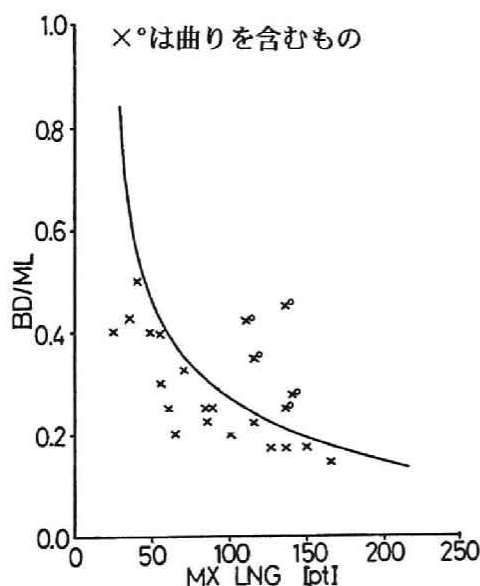


図2.10 切断型異常染色体の分布

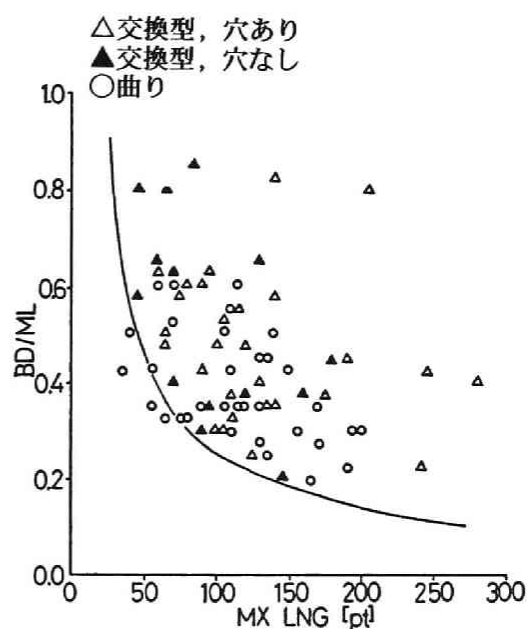


図2.11 交換型異常および曲り染色体の分布

図2.10における識別曲線は図2.7と同様の考え方で設定した。図2.10にプロットした染色体のうち、識別曲線の下方に存在するものを切断型異常染色体と識別すればよい。

PM/CPM値が増大した切断型異常染色体も、大略的形状に変化はないため、大部分は正常染色体の分布域（識別曲線の下側）に分布していることがわかる。しかし、切断型異常染色体が曲りを伴う場合には、識別曲線の上方にプロットされてしまう。この方法では、これらの染色体を、切断型異常染色体であると識別することはできず、(D)に述べるように交換型異常染色体または曲り染色体として誤識別されてしまう。

図2.10における識別状況をまとめる。

- ① 図2.7で識別された切断型異常染色体のうち、78.3%が正しく切断型異常染色体であると識別された。
- ② 曲りを伴う切断型異常染色体に対してはその異常を検出することができない。それらはこの時点では曲りまたは交換型異常と判定される可能性がある。

(D) 交換型と曲りの識別

図2.7で抽出された染色体のうち、BD/ML値が正常染色体の分布域にないものを交換型として抽出する。図2.11は、図2.7で抽出された交換型異常染色体と曲り染色体をプロットしたものである。交換型異常染色体の場合、正常染色体と比較してPM/CPM値の増大とともにBD/ML値も増大するので、正常染色体の分布域よりも上方に分布している。しかし、曲り染色体も、PM/CPM値の増大、BD/ML値の増大という点では交換型異常染色体と同じなので、同様に正常染色体分布域の上方に分布している。逆にこの段階で正常染色体分布域（識別曲線の下方）に存在すれば、それらの染色体は切断型異常染色体であると判断してしまうことになる。

図2.11における識別状況をまとめる。

- ① 図2.7で抽出された交換型異常染色体のすべてが切断型異常とは区別できた。
- ② 図2.7で抽出された曲り染色体のうち、86.2%が切断型異常とは区別された。残りは切断型異常染色体であると誤識別されたことになる。

さらに図2.11中には、交換型異常染色体について、その画像の中に穴の認められるものと認められないものとを区別してプロットしてある。本識別段階では、識別曲線の上方に存在するものを交換型異常染色体または曲り染色体として識別したわけであるが、その後、画像内に穴が認められれば、それらを交換型異常染色体とし

て識別してしまうことにする。PM/CPM値とBD/ML値がともに正常染色体よりも大きく、かつ穴が認められるような構造の染色体は、交換型異常染色体として識別してさしつかえないと判断したためである。この結果、残る識別段階は、穴をもたない交換型異常染色体と曲り染色体とを区別する段階である。

(E) 曲り染色体の除去

一般に、BD/ML値を与えればそこに入るべき曲り染色体形状は決定され、PM/CPM値も決定されるものと推察される（図2.12参照）。幾何学的にはこれには大きさの条件が必要であるが、実際には比較的小さな曲り染色体は図2.7および図2.11で正常染色体域に存在することが多いため、ここで除去すべき染色体は、25本のうち大きいほうから数えて7番目までの染色体である場合がほとんどであった。（CHLの場合、最も大きくその大きさがほぼ同じ染色体が4本あり、そのつぎに大きくその大きさがほぼ同じ染色体が3本ある。）したがってここでは大きさの条件はとりあえずはずして考える。以上のことから曲り染色体においては、BD/ML値とPM/CPM値は1対1対応に近いことが期待される。実際、図2.11で抽出された曲り染色体を、BD/MLを横軸、PM/CPMを縦軸にしてプロットすると図2.13のように極めて狭い帯

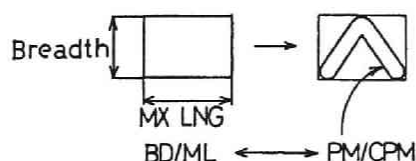


図2.12 曲り染色体のBD/ML値とPM/CPM値

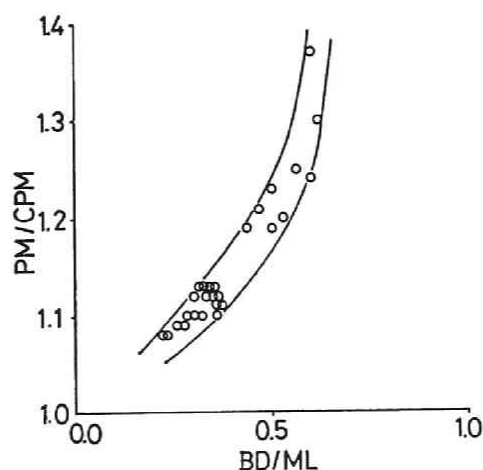


図2.13 曲り染色体の分布

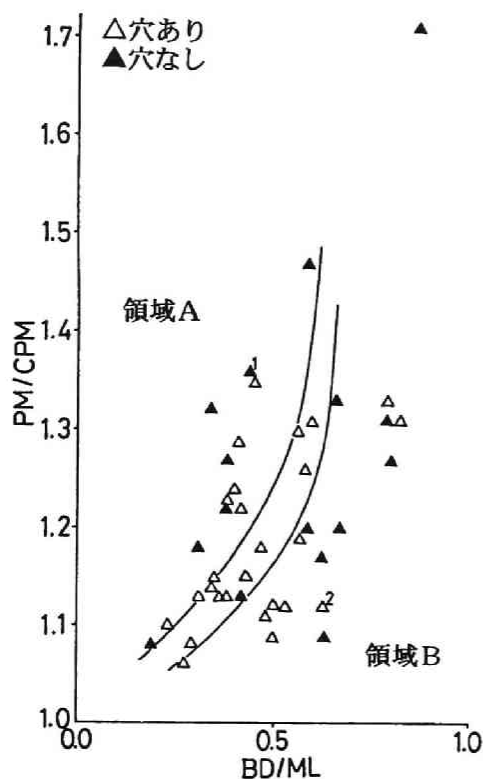


図2.14 交換型異常染色体の分布

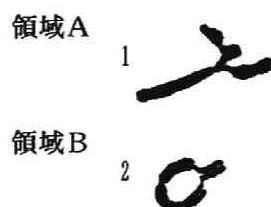


図2.15 曲り染色体の存在域の外側に存在する交換型異常染色体 (番号は図2.14中で付けたもの)

域に存在することがわかった。そしてこの対応関係からはずれた染色体は曲りとは異なるなんらかの構造をもつものと推察される。

図2.11で抽出された交換型異常染色体をプロットしたものが図2.14である。穴をもつ交換型異常染色体はこの段階では識別する必要はないが、ここでは参考のために穴をもつ染色体をも同時に示した。全体としては、76.2%が曲り染色体域の外に存在した。識別状況としては、曲り染色体域に存在する穴のない交換型異常染色体 (▲印) は1つあり、これだけが曲り染色体と誤識別されたことになる。

さらに曲り染色体域の外側に存在する交換型染色体形状について言及しておく。図2.14で領域A (曲り染色体域の上側) に存在するものは、あるBD/ML値をもつ曲り染色体よりもそのPM/CPM値が大きい。すなわち外形がかなり複雑なものである。領域B (曲り染色体域の下側) に存在するものは、あるBD/ML値をもつ曲り染色体よりもそのPM/CPM値が小さい、すなわち周囲長と包絡周囲長が比較的近い値である

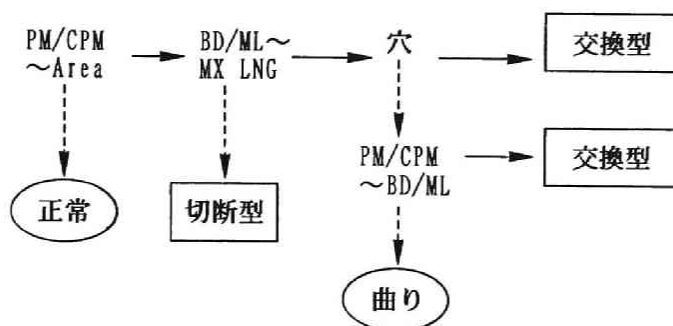


図2.16 染色体異常の識別方法
 —→ 検出
 ----→ 不検出

ことを示す。曲り染色体がそのような構造を示すことはない。図2.15にこれらの例を示す。

(F) 識別結果のまとめ

以上述べた染色体異常の識別方法をまとめて図2.16に示す。

表2.1に示した全染色体の識別結果を表2.3に示す。表中の識別率とは、例えば1本の交換型異常染色体があったとき、これを正しく交換型異常染色体であると識別できる確率を意味する。表は例えば、解析対象とした染色体のうち曲りを除く正常なものは全部で690本あったが、画像解析の結果、このうち正しく正常と識別できたものは679本、誤って切断型異常、交換型異常と識別されたものはそれぞれ9本、2本であり、その識別率は98.4%であることを示している。

切断型全体の識別率は47.4%と低い、交換型全体では91.1%と高い識別率が得られ、交換型異常の検出については実用にたえるものと判断される。

ところで発癌物質の多くのは交換型異常を多く出現させる傾向にあるとされ、石館^{8) 9)}は検体の一定濃度 [mg/l] あたりの交換型異常染色体をもつ細胞の出現頻度 (TR値と称している) を試験結果の定量的比較方法のひとつとして考案している。したがって、本識別法によって交換型異常染色体のみを検出していくのも不適切ではないと考える。

つぎに、異常染色体のうち誤識別されたものの例を表2.4に、また正常染色体のうち誤って異常と識別されたものは15本あったがその例を表2.5に示す。

表2. 3 異常アトラス染色体の識別結果

			正誤	画 像 解 析 結 果			計	識別率		
				正常	異常					
					切断型	交換型				
染 色 体 構 造	正 常	曲り 除く	正誤	679 —	— 9	— 2	679 11	98.4%	97.9%	
		曲り	正誤	25 —	— 4	— 0	25 4	84.0%		
	切 断 型 異 常	atten- uation	正誤	— 9	6 —	— 0	6 9	40.0%	47.4%	
		gap	正誤	— 3	5 —	— 0	5 3	62.5%		
		break	正誤	— 5	7 —	— 1	7 6	53.8%		
		染色体 断片	正誤	— 2	0 —	— 0	0 2	0.0%		
	交 換 型 異 常	染色体 内	完全	正誤	— 2	— 0	12 —	12 2	85.7%	91.1%
			不完全	正誤	— 0	— 0	1 —	1 0	100.0%	
		染色体 間	完全	正誤	— 1	— 0	13 —	13 1	92.3%	
			不完全	正誤	— 0	— 0	12 —	12 0	100.0%	
		生成機 序不明	正誤	— 0	— 0	3 —	3 0	100.0%		
		二動原 体	正誤	— 1	— 0	0 —	0 1	0.0%		

表2.4 識別不能な異常染色体の例

1. 切断型

異常種類	識別結果
 gap	正常
 break	曲り
 break および gap	交換
 染色体断片	正常
 染色体断片	正常

2. 交換型









異常種類	識別結果
 染色体内完全型	正常
 染色体内完全型	正常
 染色体間完全型	曲り
 二動原体	正常 (以上4種のみ)

表2.5 正常染色体の誤識別の例

識別結果
 切断型
 切断型
 曲り (正常)
 交換型

第4節 実際標本の画像解析

4. 1 実験方法

細胞株は新生チャイニーズ・ハムスター雌の肺細胞（細胞名CHL/1U，大日本製薬）を使用した。本細胞は Eagle MEM 90% + ウシ胎児血清 10% の培養液を用い、37℃にて継代培養しておく^{10) 11)}。

試験物質は、代表的発癌物質の1つであるMNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)，トリハロメタンの1つであるクロロホルム，第3章で述べる消毒処理によって生成が確認されたホルムアルデヒド，アセトアルデヒド，プロピオンアルデヒド，ブチルアルデヒドの直鎖低分子アルデヒド、の計6物質をとりあげた。ホルムアルデヒド，アセトアルデヒド，プロピオンアルデヒドは蒸留水に溶解し、MNNG，ブチルアルデヒドはエタノールで溶解したものを試料とした。なお、エタノールは培養液中濃度が1%までは染色体異常試験に影響を及ぼさない。また、クロ

ロホルムの試験に際しては、別途、所定濃度のクロロホルムを含む Eagle MEM 90% + ウシ胎児血清 10% の培養液を作製（除菌ろ過済み）しておき、継代後1日目に本培地と培地交換した。

継代後1日目または2日目のCHL培養液中に試料を添加（クロロホルムは培地交換）し、24時間培養した。その後、0.2mg/l となるようにコルセミドを加えてさらに2時間培養した後、染色体標本作製した⁶⁾。

標本は1000倍で検鏡するとともに、図2.4に示すように顕微鏡画像を直接テレビカメラより入力した。異常アトラス染色体と同様に、2値化した後、重なり染色体や異物の除去、接触部分の切り離しなどをディスプレイ上でマニュアル操作によって行った。その後、染色体画像1本1本について、各パラメータの測定値を得た。本実験では原則として各濃度任意の50個の染色体像に対し画像解析を行った。CHL細胞は25本の染色体をもっているため、1染色体標本中、1250本の染色体を解析対象としていることになる。

異常識別にあたっては、異常アトラス染色体と実際標本の染色体ではディスプレイ上の大きさ（画素数）に違いがあるため、図2.7の識別曲線、図2.9の識別曲線（図2.10、図2.11も同じ曲線）をそのまま適用するには無理がある。表2.1の異常アトラス染色体35標本の正常染色体と、図2.5の自製正常染色体のディスプレイ上での大きさ（画素数）を比較したところ、実際標本は異常アトラス染色体に対してAreaが0.53、MX LNGが0.67であった。そこで実際標本の異常識別に対しては、図2.7、図2.9の識別曲線を上記比率にしたがってそれぞれ左方へシフトしたものを用いた。

4.2 実験結果

MNNGの試験結果を図2.17に示す。縦軸は、任意の50細胞の染色体像に対し画像解析を行った結果、検出された交換型異常染色体の数を表す。CHLに対する投与濃度に対して明らかな濃度依存性が認められる。また、投与濃度0（コントロール）のCHL染色体に対して同じ識別方法を適用したところ、図2.17の例では、交換型異常検出数が5/50細胞となった。コントロールのCHL細胞の染色体に交換型異常が生起していることは稀であり、これらのほとんどは正常染色体を誤識別したものである。

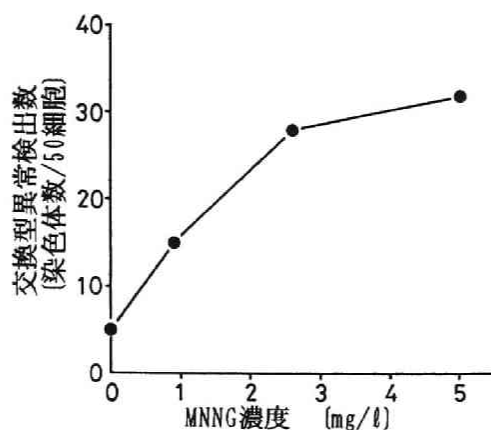


図2.17 MNNGを投与したCHLの染色体の画像解析

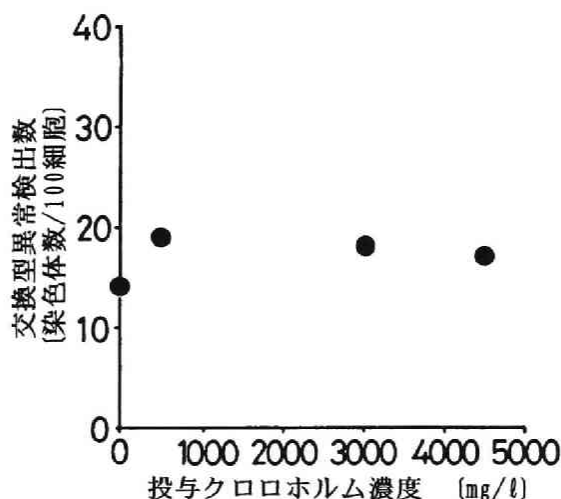


図2.18 クロロホルムの染色体異常誘発性

クロロホルムの結果を図2.18に示す。この場合、100細胞の染色体を解析対象としている。本実験における最高投与濃度4500mg/lはクロロホルムの溶解限度に近い濃度であるが、クロロホルム投与により、交換型異常の生成が有意に増加したとはいえない結果になっており、本物質は直接には染色体異常誘発性は弱いと推察される。

ホルムアルデヒドの結果を図2.19に、他の低分子アルデヒドの結果を図2.20に示す。すべての試料で、投与濃度に対して濃度依存性があるようにみえる。また、ホルムアルデヒドの染色体異常誘発性が他の3物質に比べて非常に強く、また分子量

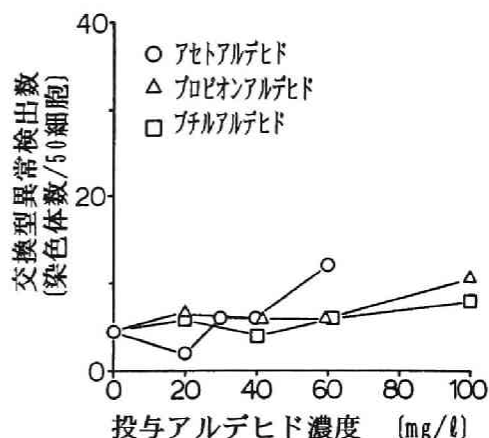
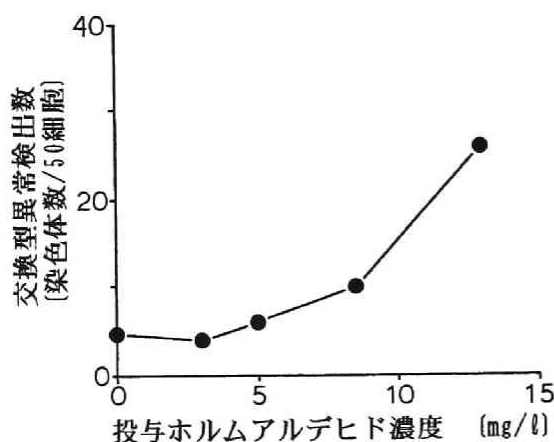


図2.19 ホルムアルデヒドの染色体異常誘発性 図2.20 アルデヒドの染色体異常誘発性

が増大するほど染色体異常誘発性が弱くなる傾向があることがわかる。

つぎに各試料の染色体異常誘発性の有無の判定基準について示す。コントロールCHL細胞の染色体標本計12標本を画像解析に供し、交換型異常染色体検出率を求めた結果を図2.21に示す。この平均値は、4.5/50細胞であったので図2.19、図2.20にはこの値をプロットしている。標準偏差は2.6であった。この分布に対し、危険率5%， χ^2 検定によって正規分布性を確認した後、95%存在域を求めると8.7/50細胞以下となった。そこで、交換型異常染色体検出率が8.7/50細胞以上となった試料を染色体異常誘発性が陽性と判定することにする。また、染色体異常の誘発強度は、100細胞あたりの交換型異常検出数の増加量を試験物質の投与濃度で割って求める。各投与濃度ごとに誘発強度が求まるが、それらのうちの最大値を誘発強度値として採用する。この誘発強度の値と、染色体異常誘発性の有無についての判定

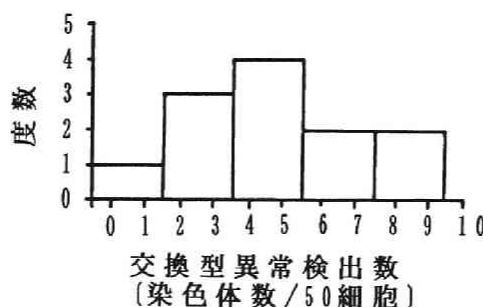


図2.21 コントロール標本の交換型異常検出数分布

表2.6 試験物質の変異原性の評価

試験物質	染色体異常試験		Rec-assay ^{1,2)}	umuテスト ^{1,3)}	Ames試験 ^{1,4)}
	誘発強度*	判定			
MNNG	2.3×10	+	++		+
クロロホルム	2.0×10^{-2}	-	-	- (+)*	+
ホルムアルデヒド	3.3	+	++	+	+
アセトアルデヒド	2.5×10^{-1}	+	-	+	+
プロピオンアルデヒド	1.3×10^{-1}	+	-	-	-
ブチルアルデヒド	7.0×10^{-2}	-			

* : 100細胞あたりの交換型異常検出数の増加量を試験物質の投与濃度で割って求める。求められた値のうちの最大値を誘発強度として示した。判定はすべて代謝活性化を行わない場合の試験結果に基づく。
 ++ : 強陽性, + : 陽性, - : 陰性 (ただしそれぞれの試験方法において比較されたもの)

* : 反応時間を長くすると陽性になったもの。

結果を表2.6に示す。このうち、クロロホルムは最高投与濃度4500mg/ℓにおいても陽性判定基準以下であったので陰性と判定している。ブチルアルデヒドはすべての投与濃度において陽性判定基準以下であり、陰性と判定した。表2.6では、これらの判定結果を他の変異原性試験での判定結果と比較して示した。とりあげた変異原性試験法は、Rec-assay^{1,2)}, umuテスト^{1,3)}, Ames試験^{1,4)}であり、代謝活性化を行わない場合の試験結果のみを示した。MNNGとホルムアルデヒドはいずれの試験でも陽性となっている。クロロホルムはAmes試験でのみ陽性という結果であるが、umuテストでは反応時間を長くすると陽性になるという結果も得られている。アルデヒドは、ホルムアルデヒド以外では判定結果に差が現れているものの、ホルムアルデヒドの変異原活性が最も強く、他のアルデヒドはそれと比較して非常に低いという点は一致している。本実験の結果では、プロピオンアルデヒドも陽性と判定されているが、その染色体異常誘発強度は小さい。

以上のように、前節までに開発した異常染色体の検出方法を実際標本に適用したところ、いくつかの試験物質について交換型異常染色体検出数の投与濃度に対する依存性を示した。これは本法が、試料の変異原性の強さを相対的に比較する目的には十分使用可能であることを示すものである。そこで第3章では、この画像解析法

を、塩素と代替消毒剤による処理水の変異原性の強さの相対的な比較に使用する。

第5節 結語

染色体異常試験における異常染色体を客観的に定量化するために、画像解析を導入した。すなわち、染色体の1本1本に着目し、これを正常染色体と異常染色体に識別する方法を開発することを試みた。特徴は、検鏡に依存していない点で、あらかじめ専門家が正常・異常の判断をした染色体異常アトラスをまず解析対象とした。その結果、開発した識別方法の信頼度を高い客観性を有しつつ定量化することができた。

特に交換型異常1本1本に対する識別では91.1%という高い識別率が得られ、実際標本の画像解析に本識別方法を供しうるものと判断された。

また実際に、標準試料を投与したCHL細胞の染色体を画像解析した結果、MNNG、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒドについて、交換型異常染色体検出数の投与濃度に対する依存性が示され、染色体異常誘発性が陽性と判定した。一方、クロロホルム、ブチルアルデヒドについては、染色体異常誘発性は陰性と判定した。これらの結果、本画像解析法が、試料の変異原性の強さを相対的に比較する目的には十分使用可能であることが示された。

参考文献

- 1) 小泉明, 日暮真編, 環境細胞遺伝学序説, 医歯薬出版, 1979
- 2) 尾上守夫編, 医用画像処理, 朝倉書店, 1982
- 3) Loeb, J., Image Analysis, Joyce Loeb, A Vickers Company, 1985
- 4) Wald, N., Li, C. C., Herron, J. M., Davis, L., Fatora, S. R., and Preston K., Automated Analysis of Chromosome Damage, Automation of Cytogenetics, pp. 39-45, Asilomar Workshop, Pacific Grove, California, Nov. 30 - Dec. 2, 1975, CONF-751158
- 5) Aggarwal, R. K., and Fu, K. S., A Pattern Classification System for The

Identification of Irradiated Chromosome, IEEE Trans. on Biomedical Engineering, BNE-24, No. 2, pp. 178-185, 1977

6) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, 化学物質による染色体異常アトラス, 朝倉書店, 1988

7) 丸谷洋二他, 画像処理装置とその使い方, 日刊工業新聞社, 1989

8) 石館基, 環境変異原性物質検出法の現状とその評価, 水質汚濁研究, Vol. 4, No. 3, pp. 127-136, 1981

9) 石館基監修, 染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー, 1987

10) 高岡聡子, 組織培養入門 生き続ける培養細胞, 学会出版センター, 1986

11) 日本組織培養学会編, 組織培養の技術, 朝倉書店, 1988

12) Matsui, S, Yamamoto, R., and Yamada, H., The *Bacillus subtilis*/microsome Rec-assay for The Detection of DNA Damaging Substances Which May Occur in Chlorinated and Ozonated Waters, Water Science and Technology, Vol. 21, pp. 875-887, 1989

13) 小野芳朗, 宗宮功, 河村正純, 化学酸化処理での反応生成物の遺伝毒性に関する研究, 水質汚濁研究, Vol. 14, No. 9, pp. 633-641, 1991

14) Zeiger, E., Carcinogenicity of Mutagens : Predictive Capability of *Salmonella* Mutagenesis Assay for Rodent Carcinogenicity, Cancer Research, Vol. 47, pp. 1287-1296, 1987

第3章 画像解析法による消毒処理水の染色体異常試験

本章は、塩素、二酸化塩素、クロラミン、オゾンを取りあげ、各消毒剤で濃縮自然水を処理し、その処理水の染色体異常誘発性を比較検討することを目的とする。染色体異常試験における異常染色体の検出、定量化には第2章で開発した画像解析法を適用する。

第1節 消毒処理水の変異原性に関する既往の研究

ここではフミン質や水道原水を各消毒剤で処理し、その処理水の変異原性を比較した研究についてまとめる。変異原性試験法はほとんどがAmes試験であり、以下特に断らない限りAmes試験による結果を述べている。これまでに行なわれた主な研究結果を表3.1に示す。

代表的な結果は、ミシシッピ川の水を用いて実験を行ったMeierとBull²⁾によって得られている。すなわち、塩素処理水の変異原性が最も強く、クロラミン処理水の変異原性も確認された。二酸化塩素処理水の変異原性はわずかであり、オゾン処理水の変異原性は認められなかった。しかしこの結果は、対象水、試料調製方法などによって変化する。その他、オゾンは原水の変異原性を低下させる作用があること、オゾン処理水の変異原性については、変異原性が認められない例や認められる例があるなど一定ではない、などの知見が得られている。

これらの研究では、原水を消毒処理した後、まずXAD-2などの樹脂に通水する。吸着物質を有機溶媒で溶出し、溶媒を減圧濃縮して乾固した後、DMSOなどで再溶解したものを試料としている。したがって例えばオゾン処理によって多く生成すると思われる親水性物質は、XAD-2などの非イオン性樹脂には吸着しにくく試験対象となっていない問題点が指摘されている¹²⁾。

哺乳動物個体を対象として、各消毒処理水の有害性を比較した研究は少ないが、Bull¹³⁾らの例がある。Bullらは、マウスに各消毒処理水を皮下注射し、腫瘍形成性を調べた。結果を表3.2、表3.3に示す。表3.2の皮膚における腫瘍形成性を調べ

表 3. 1 消毒処理水の変異原性の比較研究例

試料	処理	濃縮法	溶媒	活性画分	結果	文献
Lake Savojarvi	pH, Cl, O ₃ and floc, pH, Cl, O ₃	XAD-4, XAD-8	EtOAc	酸性	Cl水が大, O ₃ 水もあるが高注入率では減少	1
Mississippi River	Floc, sfilt, Cl or O ₃ or NH ₂ Cl or ClO ₂ , GAC, Cl	XAD-8, XAD-2	ACTN	酸性	Cl水が最大, NH ₂ Cl水で確認, ClO ₂ 水で僅か, O ₃ 水はなし	2
Rhine/Meuse River	pH, Cl or O ₃ or ClO ₂ , UV, FeCl ₃ safilt, GAC	XAD-4, XAD-8	DMSO	中性	Cl水とClO ₂ 水は同程度, O ₃ +UVが最も低い O ₃ は原水の変異原性を低下	3
Mississippi River	Floc, F, sfilt, O ₃ or ClO ₂ or NH ₂ Cl or Cl or nothing sfilt or GAC	逆浸透膜 XAD-8, XAD-2	ACTN	酸性	Cl水が最大, ついでNH ₂ Cl水, ClO ₂ 水の順 O ₃ 水はなし	4
Rhine/Meuse River	Cl ₂ or O ₃ only (and dfilt, GAC)	XAD-4, XAD-8	DMSO ACTN	中性/ 酸性	O ₃ は原水の変異原性を低下 Clは増大	5
Houille River	Cl, floc, flot, GAC, O ₃ or Cl	XAD-4, XAD-2	DCM/MeOH	酸性	Cl水とO ₃ 水は同程度 (前塩素処理水)	6
Seine River, wells	Aer, bionit, O ₃ GAC, Cl	XAD-4, XAD-2	DCM/MeOH	酸性	O ₃ で増大, 注入率12mg/l, 接触時間30分で最大	6
Seine River	Floc, rsfilt, O ₃ GAC, Cl, ClO ₂	XAD-4, XAD-2	DCM/MeOH	酸性	O ₃ は原水の変異原性を低下	6
泥炭地着色水	Cl, NH ₂ Cl, ClO ₂	蒸発乾固	DCM	中性	NH ₂ Cl水はCl水の1/7倍の強さ, ClO ₂ 水はなし	7
泥炭地着色水	Cl, O ₃	XAD-2	DCM/MeOH	酸性	Cl水と比較してO ₃ 水は僅か	8, 9
淀川	Cl, O ₃	XAD-2	DCM/MeOH	酸性	原水の変異原性が高い。原水, Cl水, O ₃ 水, O ₃ -Cl水の順に減少	10
N. Saskatchewan River	Floc, Sfilt, Cl or ClO ₂ or O ₃ or NH ₂ Cl or nothing, GAC, Cl	XAD-2	ACTN (15%) /C6 (85%)	中性	Cl水が高頻度, NH ₂ Cl水でもしばしば確認, ClO ₂ 水, O ₃ 水はなし	11

Floc—flocculation, flot—flotation, sfilt—sand filtration, safilt—sand and anthracite filtration, rsfilt—rapid sand filtration, dfilt—dune filtration, F—fluoride, Cl—chlorination, NH₂Cl—chloramins, ClO₂—chlorine dioxide, O₃—ozone, UV—ultraviolet light, pH—pH adjustment, FeCl₃—ferric chloride, GAC—granular activated carbon, bionit—biological nitrification, aer—aeration
EtOAc—ethyl acetate, ACTN—acetone, C6—hexane, DMSO—dimethylsulfoxide, DCM—dichloromethane, MeOH—methanol
Cl水—塩素処理水, NH₂Cl水—クロラミン処理水, ClO₂水—二酸化塩素処理水, O₃水—オゾン処理水

表3. 2 消毒副生成物による皮膚腫瘍の形成性^{1,3)}

試料	濃縮 倍率	腫瘍を形成 した個体数	腫瘍の 総数	腫瘍総数 個体数 $\times 100$
未処理水	102	0/25	0	0
塩素処理水	106	4/25	5	20
クロラミン処理水	142	5/25	8	32
二酸化塩素処理水	168	0/25	0	0
オゾン処理水	186	7/25	9	36
塩類溶液	—	1/25	1	4
*DMBA	—	16/25	35	140

実験は各試料のイニシエーション作用を調べたもの。プロモーターとしてはTPA (12-o-tetradecanoylphorbol) が用いられた。

*DMBA—7, 12-dimethylbenz (a) anthracene

表3. 3 解剖時に検鏡によって観察された病変^{1,3)}

試料	皮膚腫瘍		組織腫瘍		
	バピローム	扁平上皮がん	肺アデノーム	乳腺腫	胃腫
未処理水	0	1	0	0	0
塩素処理水	1	3	2	0	0
クロラミン処理水	1	2	5 (4)	0	0
二酸化塩素処理水	0	0	4 (3)	3	1
オゾン処理水	2	2	1	0	0
塩類溶液	0	1	1	2	0
*DMBA	8 (6)	1	0	0	0

() は腫瘍数と腫瘍形成個体数が異なるときの腫瘍形成個体数を示す。

*DMBA—7, 12-dimethylbenz (a) anthracene

た例では、二酸化塩素処理水のみには腫瘍形成性が見られず、他の3種に腫瘍形成性が見られる。しかし顕微鏡観察結果を示した表3.3では、二酸化塩素処理水でも病変が起きており、有害性の大小についての明確な結論は得られていない。

第2節 実験方法

(1) 試料の作製方法についての考え方

第1節に示したように、塩素、クロラミン、二酸化塩素、オゾンを用いて処理し、その処理水を濃縮したものを試料として変異原性を比較すると、その強さは、オゾン<二酸化塩素<クロラミン<塩素 の順となることがしばしばあるといわれる。

しかし、この際の濃縮方法は多くの場合、まず消毒処理水をXAD-2等の樹脂に通水して吸着させる。その後有機溶媒で溶出し、溶媒を減圧濃縮して乾固した後、DMSOなどで再溶解したものを試料としている。この方法では、実際に消毒処理した水を対象とすることができる反面、ホルムアルデヒドなど親水性物質はXAD-2等の非イオン性樹脂には吸着しにくいであろうし、溶媒を乾固することからクロロホルムなどの揮発性物質は最終的に試料中に入っていないなど、副生成物を平等に濃縮することができない。本研究のように異なる消毒処理水の変異原性の比較を行う場合、この点には特に注意する必要がある。それは消毒剤が異なれば有機物との反応性も異なり、生成物の種類も異なることが予想されるため、同じ濃縮方法を採用した場合、変異原性の強さの評価が不平等になる恐れがあるからである。

そこで本研究では、消毒副生成物全体の染色体異常誘発性を測定することを目的に、最初に自然水を濃縮した上で消毒処理を行い、処理水をそのまま染色体異常試験に供する方法を採用した。すなわち、自然水をXAD-2樹脂に通水した後、吸着成分を溶媒抽出し、乾固した残渣を蒸留水に再溶解して濃縮水を作製する。この試料に消毒剤を加えて処理し、これをそのまま染色体異常試験の試料とした。もちろんこの方法では、自然水中に存在する物質のうち、濃縮できた疎水性物質しか消毒処理の対象にならないという限界もある。

(2) 濃縮琵琶湖水の作製

吸着樹脂には、自然水中の疎水性物質の濃縮に広く利用されているXAD-2¹⁴⁾（オルガノ製）を用いた。

XAD溶出成分には変異原性がある場合があるとされ、使用に際してはこれをよく洗浄する必要がある。XAD-2樹脂を、蒸留水、メタノール、ジエチルエーテルの順に溶媒を変えて、各1日、スターラー攪拌して洗浄した。後述する方法と同様にカラムに充填し蒸留水を通水したとき流出水の E_{260} は0.001以下となり、十分洗浄できていた。また洗浄済みXAD-2の空試験を行うため、洗浄済みXAD-2を分液ロートに入れ、ジエチルエーテル（未開封のもの）で2度抽出する。無水硫酸マグネシウムで脱水した後、エバポレータで蒸発乾固させる。残渣を蒸留水で再溶解した試料を染色体異常試験に供した。結果を図3.1に示す。試料中に含まれるXAD-2抽出物量が、XAD-2容積として100mlまでの範囲において染色体異常誘発性は認められず、満足できる結果であった。

なお、投与量0（コントロール）における異常染色体検出率の平均値は、4.5/50

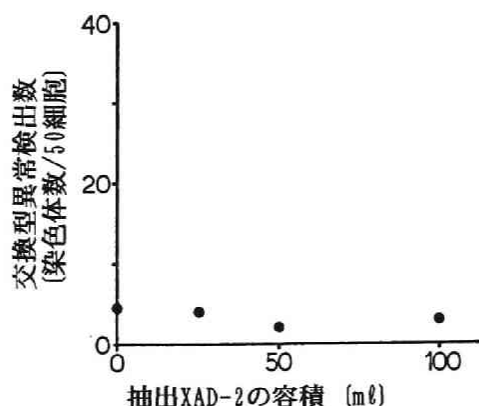


図3.1 XAD-2溶出成分の染色体異常試験

表3.4 琵琶湖水と濃縮琵琶湖水の水質

	pH	E ₂₆₀	過マンガン酸カリウム消費量 (mg/l)
琵琶湖水 ('91. 5. 29)	7.08	0.060	3.6
濃縮琵琶湖水	7.11	10	1650

細胞であったので、図3.1にはこの値をプロットした。これは第2章 図2.21に示したように、コントロール試験を12回行った平均値で、その標準偏差は2.6であった。以下の実験においても、投与量0における異常染色体検出率は、このコントロール試験の平均値をプロットしている。

洗浄済みXAD-2約300mlを、直径5cmのカラムに充填（充填高さ約15cm）し、琵琶湖南湖表流水を約40ml/minで通水させた。このときE₂₆₀でみた除去率は、40%前後であった。350l～600lを通水させた後、空試験時と同様にXAD-2を処理して最終的にE₂₆₀が10程度になるように調製した。濃縮湖水の水質を原水と比較して表3.4に示す。この濃縮湖水の染色体異常誘発性を調べた結果を図3.2に示すが、染色体異常の有意な増加はみられず、その後の染色体異常試験のコントロールテストとして十分であった。なお、琵琶湖水のもつ染色体異常誘発性を調べることを目的とする場合には、前処理方法、濃縮方法、濃縮倍率の検討がさらに必要である。

(3) 消毒処理方法

塩素処理は次亜塩素酸ナトリウム液を添加して行った。濃縮湖水は200mMリン酸緩衝液とし、HCl, NaOHで微調整を行ってpHを7.2±0.1に調整した。pHの調整方法は

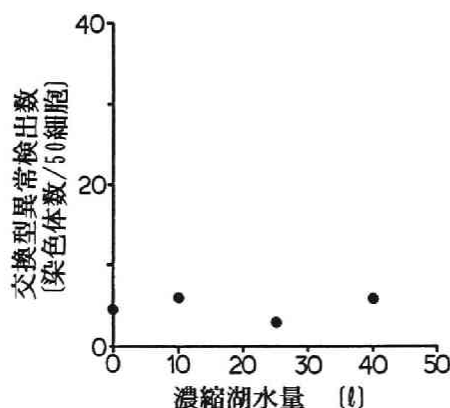


図3.2 濃縮琵琶湖水の染色体異常誘発性

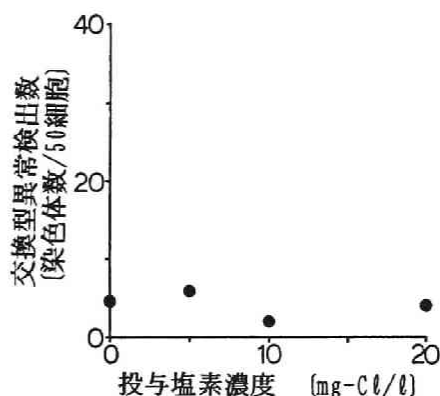


図3.3 塩素の染色体異常誘発性

他の消毒処理でも同じである。反応は室温，暗所で70時間静置して行い、この間に添加した塩素の98%以上が消費された。塩素濃度はDPD滴定法で測定した¹⁵⁾。塩素処理後、残留塩素を除去するために脱塩素剤を添加すると変異原物質をも還元作用を受けて変異原活性が著しく減少することが認められている¹²⁾ため、ここでは脱塩素剤は添加しなかった。試料水中の残留塩素が染色体異常試験の結果に及ぼす影響について調べた結果を図3.3に示す。横軸の投与塩素濃度とは、CHL培養液中の濃度を表し、それが20mg-Cl/lまでは染色体異常試験に影響していない。したがって、(5) 染色体異常試験 の項で述べるように、試料中の残留塩素濃度では200mg-Cl/lまでは染色体異常試験に影響を及ぼさないことになる。すなわち、本実験条件では残留塩素濃度が200mg-Cl/l以下となった試料について染色体異常試験を行うことが可能である。他の消毒処理においても脱消毒剤は添加しなかった。

オゾン処理は、外径17mm，高さ230mmの小型インピンジャーを用い、オゾン発生器（三菱オゾナイザOS-1N-A）で発生させたオゾンを曝気して行った。試料10mlに対し、曝気流量35ml/min，オゾン注入量3.2mg-O₃/minで曝気操作を行い、このときオゾン消費率は30%前後であった。ヨウ化カリウム吸収液を用いて、注入オゾン濃度と排出オゾン濃度とを測定し、その差をオゾン消費量とした。すなわち、オゾンの自己分解量や、試水や装置自体のもつガス吸収特性などは考慮できていない。曝気は最長2時間まで行った。なお、図3.4に示すように、投与オゾン濃度（CHL培養液中濃度）が1.2mg-O₃/l，すなわち試料中のオゾン濃度が12mg-O₃/lまでは染色体異常試験に影響を及ぼさないことも確認した。この高濃度のオゾンが染色体異常を誘発しない理由は、CHL細胞が血清やEagle MEMを含む有機物の豊富な培地

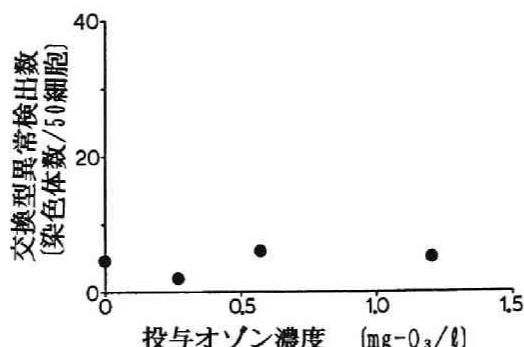


図3.4 オゾンの染色体異常誘発性

で培養されているため、オゾンを注入した後瞬間的にオゾンが消費し、その結果CHL細胞に何も影響を及ぼさなかったものと思われる。オゾン処理水は、オゾン曝気後ただちにCHLに投与した。このとき試料水中に残存する溶存オゾン自体が染色体異常試験結果に影響を及ぼさないことは、図3.4によって確認できた。また、オゾン濃度は、ヨウ素反応-吸光光度法で測定した¹⁶⁾。

クロラミンと二酸化塩素については、数千mg-Cl/lの消毒剤消費量となるように、オゾン処理時と同じインピンジャーを用い、いずれも曝気によって消毒剤を添加した。クロラミン処理は、pH10、170g/lの塩化アンモニウム溶液200mlに対し、次亜塩素酸ナトリウム溶液20mlを添加し、空気流量約20ml/minで曝気して得られるクロラミンを試料20ml中へ導入した。図3.5に、クロラミンの曝気処理中における、クロラミンの注入量と消費量を示す。発生するクロラミン量は時間とともに減少するので次亜塩素酸ナトリウム溶液を繰り返し注入して曝気を継続した。初期における注入量は約0.04mg-Cl/minで、消費率は90%以上であった。ヨウ化カリウム吸収液を用いて、曝気クロラミン量と排出クロラミン量を測定し、その差を消費クロラミン量とした。曝気は最長51時間まで行った。なお、図3.6に示すように、投与クロラミン濃度（CHL培養液中濃度）が30mg-Cl/l、すなわち試料中のクロラミン濃度が300mg-Cl/lまでは染色体異常試験に影響を及ぼさないことも確認した。この結果、本実験条件において試料水中に残存するクロラミンは染色体異常試験結果に影響を及ぼさないことが確認できた。また、クロラミン濃度は、DPD滴定法で測定した¹⁵⁾。

二酸化塩素処理は、13g/l亜塩素酸ナトリウム溶液250mlに(1+9)硫酸5mlを添加し、空気流量約20ml/minで曝気して得られる二酸化塩素を試料20ml中へ導入した（途

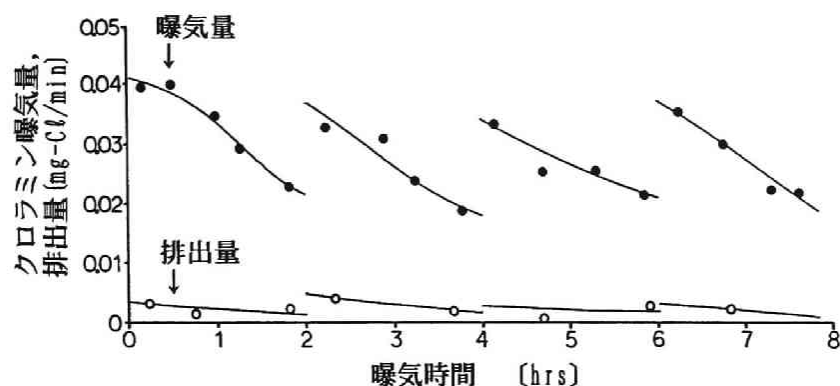


図3.5 クロラミン処理条件

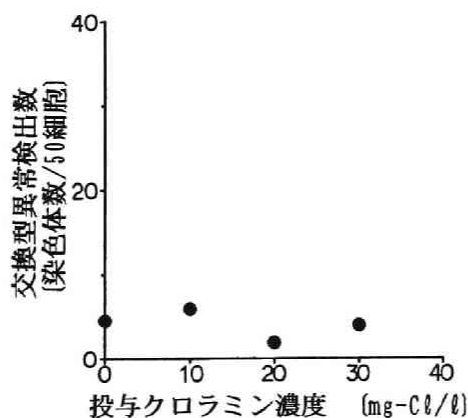


図3.6 クロラミンの染色体異常誘発性

中亜塩素酸ナトリウム粉末を充填した洗浄層設置)。図3.7に、二酸化塩素の曝気処理中における、二酸化塩素の注入量と消費量を示す。二酸化塩素の発生が安定したときの注入量は0.19mg-Cl/minで、消費率は90%以上であった。ヨウ化カリウム吸収液を用いて、曝気二酸化塩素量と排出二酸化塩素量を測定し、その差を消費二酸化塩素量とした。曝気は最長12時間まで行った。また、二酸化塩素濃度はDPD滴定法で測定した¹⁵⁾。

(4) 副生成物の分析

塩素処理によって生成したクロロホルム濃度はmg/lのオーダーであったので、試料をジエチルエーテル抽出し、ガスクロマトグラフ (Yanaco, G180) の水素炎イオン化検出器 (FID) で測定した。カラムは25%FAL-M on 80/100 mesh Chromosorb Wを用い、カラム温度と注入口温度はそれぞれ70℃, 90℃とした。低分子アルデヒドは、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンをを用いて誘導体化¹⁷⁾し同様にFIDで測定した。

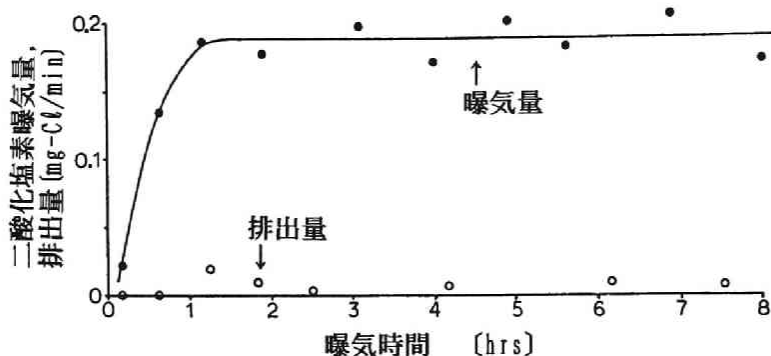


図3.7 二酸化塩素処理条件

(5) 染色体異常試験

新生チャイニーズ・ハムスター雌の肺細胞（細胞名CHL/1U，大日本製薬）を、Eagle MEM 90% + ウシ胎児血清10%の培養液を用い、37℃で継代培養しておいたものを使用した。底面積40 cm²の培養ビンを用いており培養液量は18mlとしている。継代後1日目に試料2mlを0.22μmフィルターで除菌ろ過しつつ添加した。したがって試料中の物質は培養液中で1/10に希釈されている。試料のpHは添加時に7.2±0.2に調整した。試料を添加してから24時間培養した後、染色体標本を作製した。なお培養は開放系ではなく閉鎖系で行い、また代謝活性化は行わなかった。

(6) 画像解析法

染色体標本は1000倍で検鏡するとともに、顕微鏡画像を直接テレビカメラより入力し、画像解析を行った。異常染色体のうち、画像解析により交換型異常染色体を検出、定量化した。原則として染色体像は任意の50細胞を入力し、画像解析した。CHL細胞は25本の染色体をもっているので、1染色体標本中1250本の染色体を解析対象としていることになる。

第3節 実験結果と考察

3.1 各消毒処理水の実験結果

(1) 塩素処理

塩素処理によるE₂₆₀減少を図3.8に、またpH変化を表3.5に示す。5000mg-Cl/l,

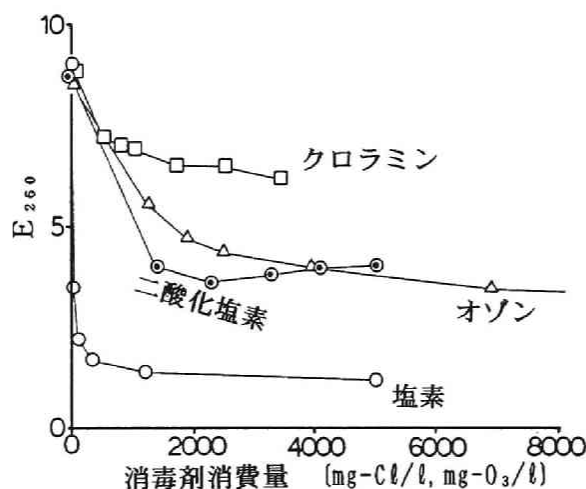
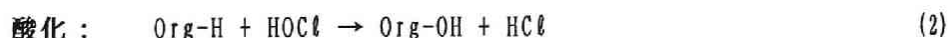
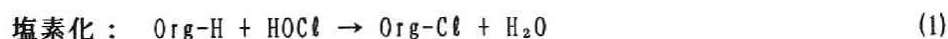


図3.8 消毒処理によるE₂₆₀減少

表3.5 塩素処理によるpHの変化

塩素添加量 (mg-Cl/l)	塩素添加時 pH	70時間後 pH
30	7.30	7.22
100	7.29	7.21
300	7.29	7.22
1200	7.11	7.10
5000	7.33	6.99

1200mg-Cl/lの塩素を添加した試料の70時間後の残留塩素はそれぞれ 100mg-Cl/l, 25mg-Cl/l, それ以外の試料の残留塩素はゼロであったので、添加した塩素のほぼ全てが消費されていた。図3.3に示したように、この残留塩素が染色体異常試験結果に影響を及ぼすことはない。図3.8より、少量の塩素でE₂₆₀の大部分が消費されてしまうことがわかる。また反応前後のpH変化を測定したところ、緩衝液中であるにもかかわらずpHはやや低下傾向にあった。HOClによる酸化反応および塩素化反応を次のように模式化して考えると¹⁸⁾



塩素化の場合、弱酸であるHOClが消費されて水を生ずるためpHは上昇し、酸化の場合、HClが生成するのでpHは低下する。したがって酸化反応の方が卓越していたものと推察される。

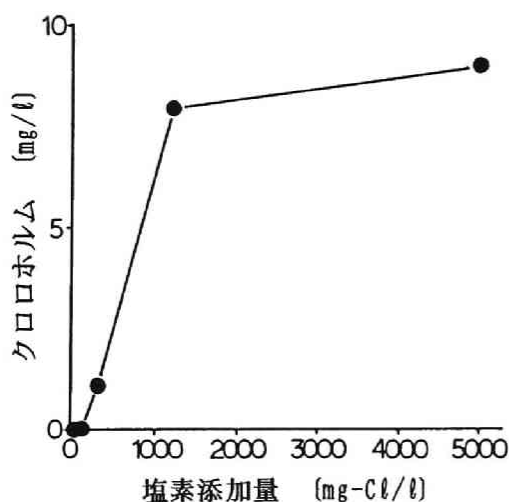


図3.9 塩素処理によるクロロホルムの生成

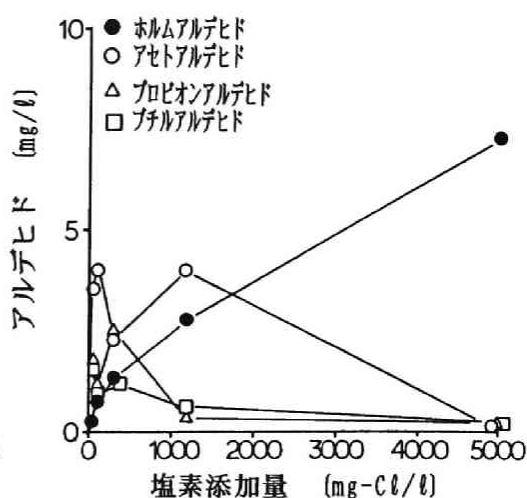


図3.10 塩素処理による低分子アルデヒドの生成

塩素処理によって生成したクロロホルム、および C_0 から C_3 までの直鎖の低分子アルデヒドを測定した結果を図3.9、図3.10に示す。第1章第3節で示したように、塩素処理においても、酸化反応がおきているためアルデヒドが生成している。

図3.11に塩素処理水の染色体異常試験結果を示す。縦軸は50細胞の染色体像をとりあげて画像解析した結果、検出された交換型異常染色体の数を示している。塩素添加量ゼロのときの値は、コントロールテストの平均値 4.5/50細胞をプロットしたものである。

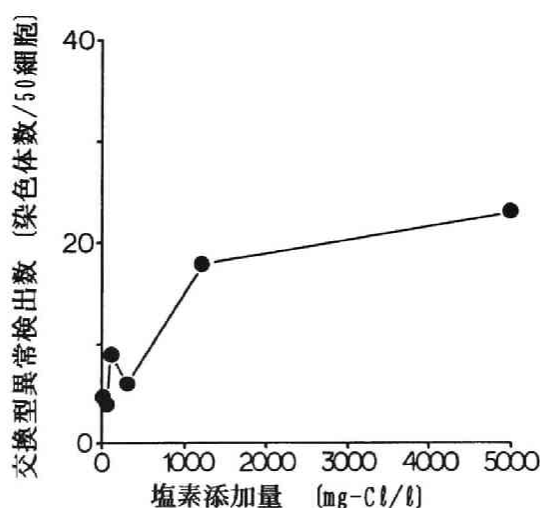


図3.11 塩素処理水の染色体異常誘発性

図3.11の染色体異常誘発性に対する、測定されたクロロホルム、低分子アルデヒドの寄与を、第2章第4節で行った実験結果から考察してみる。まず、クロロホルムの結果を示した図2.18から、数千mg/lのクロロホルムを投与しても交換型異常の生成が有意に増加したとはいえない結果になっている。したがって、図3.9のクロロホルムの生成と図3.11の染色体異常誘発性とは対応しているものの、クロロホルムの寄与はほとんどないといえる。有害性の測定指標という点では、図3.9と図3.11の対応関係から、クロロホルムの測定意義はもちろんあるが、処理水の有害性そのものを測定しているのではないことに注意する必要がある。また、ホルムアルデヒドの試験結果は図2.19に示している。図3.10でホルムアルデヒドの最高生成量は7mg/lであったが、染色体異常試験における培養液中濃度は0.7mg/lである。図2.19より、この濃度のホルムアルデヒドによる染色体異常誘発性はほとんどない。図2.20に他のアルデヒドの結果を示しているが、同様に、生成したアルデヒド濃度での染色体異常誘発性はほとんどないといえる。以上の結果、図3.11に示された染色体異常誘発性は図3.9、図3.10で測定されたクロロホルム、低分子アルデヒドでは説明されないことが明らかとなった。

染色体異常誘発性と副生成物との関係をさらに考察するため、塩素処理時のpHを変えることにより、塩素と有機物との反応性、副生成物の生成特性を変える実験を行った。

図3.12は、濃縮湖水をpHを変えて塩素処理した後の残存 E_{260} を示したもので、表3.6は反応前後のpH変化を示したものである。塩素の注入量は600mg-Cl/l、初期 E_{260} は8.9である。HOClの卓越する低pH域ほど酸化力が強いため、残存 E_{260} 値が小さく、塩素による酸化が進んでいることを示している。図3.13は、この処理水の染色体異常誘発性とクロロホルム濃度を測定したものである。塩素酸化がより進んだ低pH域の処理水の染色体異常誘発性が強い。一方、クロロホルムは、逆に高pH域の処理水に多く含まれている。高pH域では、有機塩素化合物の全体量は少ないものの、第1章第3節で示したように生成した有機塩素化合物は加水分解を受けやすいため、クロロホルム生成量が多くなると考えられる。図3.13では、染色体異常誘発性とクロロホルム生成量とが逆パターンとなった。図3.11および図2.18によって、塩素処理水の染色体異常誘発性に対するクロロホルムの寄与がほとんどないことを確認しており、図3.13は、塩素処理水の染色体異常誘発性には、クロロホルムよりも他の有機塩素化合物または他の酸化副生成物の方が重要であることをさらに確認する

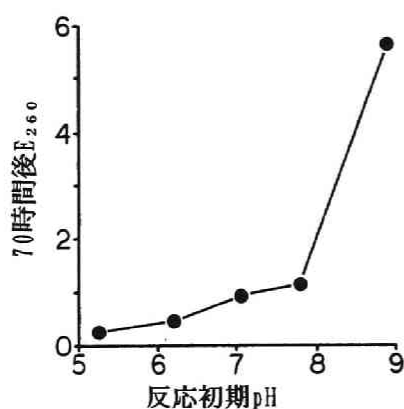


図3.12 塩素処理による E_{260} 減少に及ぼすpHの影響

表3.6 塩素処理におけるpHの変化

初期pH	70時間後pH
5.27	4.41
6.17	6.18
7.05	7.10
7.80	7.83
8.90	8.40

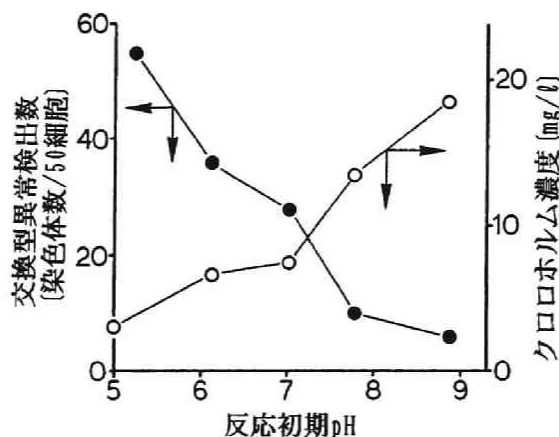


図3.13 塩素処理水の染色体異常誘発性とクロロホルム生成に及ぼすpHの影響

ものといえる。一方、生成した低分子アルデヒドを測定した結果を図3.14に示す。アセトアルデヒドは、低pH側で生成量が多く高pH側で少ないが、アセトアルデヒドはアセチル基をもつのでハロホルム反応によってクロロホルムが生成する結果とも考えうる¹⁹⁾。ホルムアルデヒドの生成量は、染色体異常誘発性とは逆傾向さえ認められる。全体的には、この種のアルデヒド類が塩素処理水の染色体異常誘発性に寄与しているとは考えにくい。

塩素処理水の染色体異常誘発性と副生成物との関係について、これまでに得られた結果を再整理すると、

- ①クロロホルムの寄与はほとんどない。

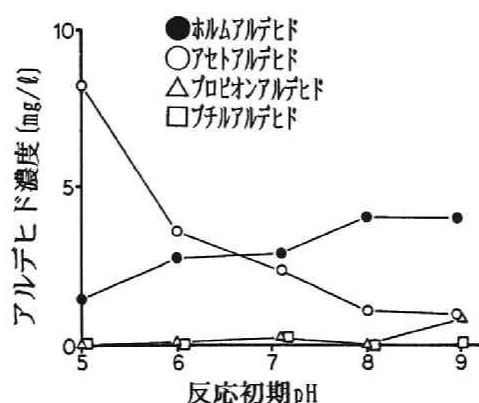


図3.14 塩素処理によるアルデヒド生成に及ぼすpHの影響

②低分子アルデヒド類の寄与もほとんどない。

③塩素によって有機物が酸化された量と染色体異常誘発性とは対応している。したがって、クロロホルムの他の有機塩素化合物あるいは他の酸化副生成物が寄与していると推察できる。

(2) オゾン処理

オゾン処理による E_{260} の変化を図3.8に示す。この間pHは約0.1低下した程度であった。図3.15に、生成した低分子アルデヒドの測定結果を示した。オゾン消費量 $12900\text{mg-O}_3/\text{l}$ がオゾン曝気時間2時間に対応する。図3.16にオゾン処理水の染色体異常試験結果を示す。オゾン消費量 $12900\text{mg-O}_3/\text{l}$ （曝気時間2時間）の試料は、C₂H₂Lに対する細胞毒性が強く細胞が死滅した結果、染色体の観察ができなかったもので、図3.16では消費量 $6900\text{mg-O}_3/\text{l}$ （曝気時間1時間）までの結果を示してある。消費量 $2000\text{mg-O}_3/\text{l}$ までは染色体異常誘発性はほとんどないこと、その後消費量増大に伴って増大し高消費量では塩素処理水を上回っていることがわかる。また、この染色体異常誘発性に対するホルムアルデヒドをはじめとする低分子アルデヒドの寄与は、これら化合物の染色体異常試験結果（図2.19, 図2.20）からみてほとんどないといえる。

(3) クロラミン処理

クロラミン処理における E_{260} 変化を図3.8に、pH変化を図3.17に示す。クロラミ

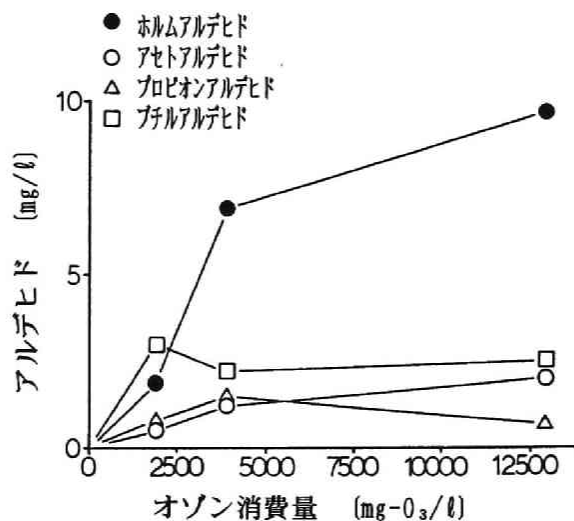


図3.15 オゾン処理による低分子アルデヒドの生成

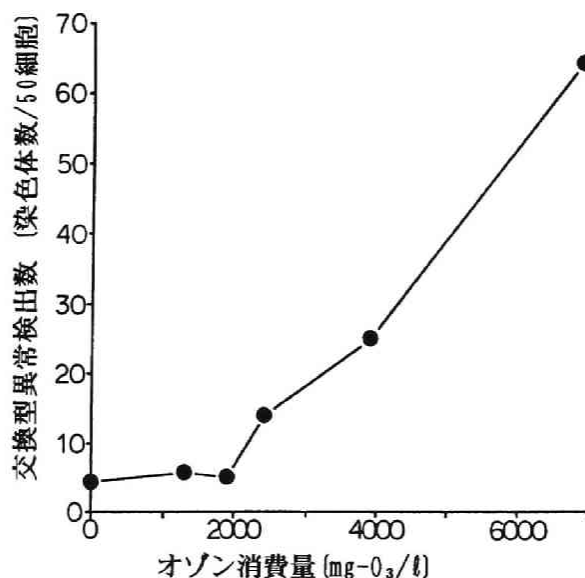
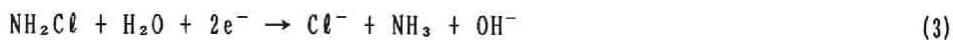


図3.16 オゾン処理水の染色体異常誘発性

ン処理の間にpHは大きく上昇した。クロラミンの酸化反応¹⁸⁾は



あるいは



で記述され、いずれもpH低下をもたらす。塩素化の場合には例えば



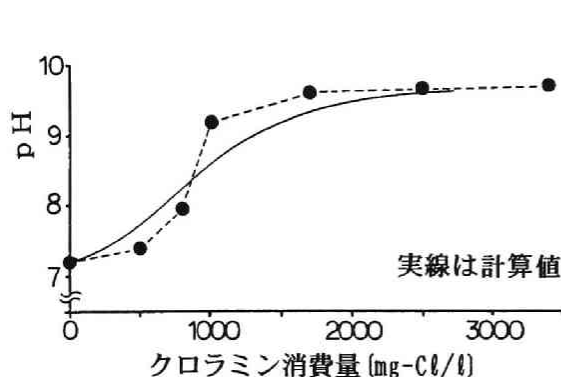


図3.17 クロラミン処理におけるpH変化

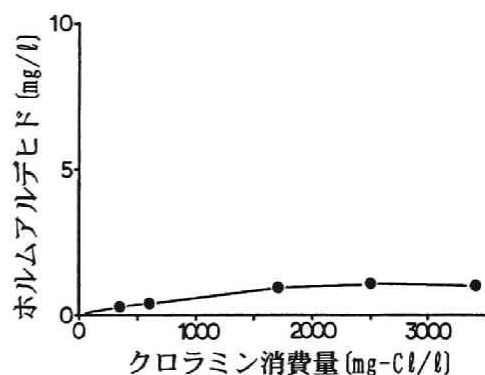


図3.18 クロラミン処理によるホルムアルデヒドの生成

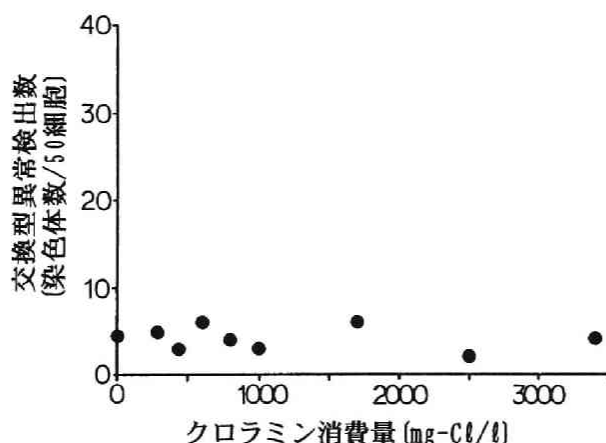


図3.19 クロラミン処理水の染色体異常誘発性

のようにpH上昇となる。いま塩素化が中心で反応が進行したとすれば、pHとクロラミン消費量の関係は、緩衝液濃度を C_B 、 $pK_a=7.2$ 、アルカリ濃度を C_{SA} 、アンモニウムの pK_a を9.3として

$$\text{クロラミン消費量} = (1 + 10^{-9.3+pH}) \left(\frac{1}{1 + 10^{-pH+7.2}} + 10^{-14+pH} - 10^{-pH} - C_{SA} \right) \quad (6)$$

と記述される。この式に従った場合のpH変化とクロラミン消費量との関係を図3.17中に実線で示した。実験値と適合していることから大部分の反応は塩素化であると推察される。

クロラミン処理による生成物は、図3.18に示すようにホルムアルデヒドのみ定量でき、その最大値は約1 mg/lで、他の低分子アルデヒドの生成は痕跡量であった。

また塩素化が反応の中心であると推察されたものの、クロロホルムの生成は認められなかった。

クロラミン処理水のpHを 7.2 ± 0.1 に調整したものを試料として染色体異常試験を行った結果を図3.19に示す。交換型異常の有為な生成は認められなかった。

図3.19の実験ではpHが大きくアルカリ側に傾いたものを試料としているので、つぎにpHをコントロールして実験を行った。図3.20に示すように、クロラミン処理中、pHは 7.0 ± 0.3 にコントロールした。 E_{260} 変化、低分子アルデヒドの生成は先の結果と大差なく、また図3.21に示すようにやはり交換型異常の有為な生成は認められなかった。

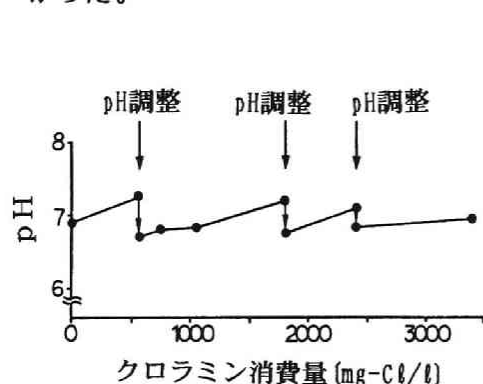


図3.20 クロラミン処理におけるpH制御

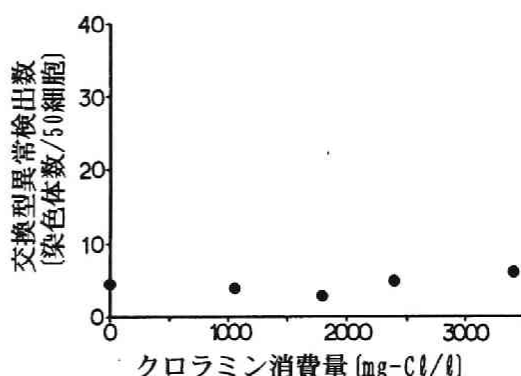


図3.21 pH制御条件下におけるクロラミン処理水の染色体異常誘発性

(4) 二酸化塩素処理

二酸化塩素処理による E_{260} 変化を図3.8に、pH変化を図3.22に示す。二酸化塩素の酸化反応¹⁸⁾は



と進むが、 HClO_2 の pK_a は2程度であるから ClO_2^- はほぼ解離し、pHは低下する。この反応が進行するとして算出したpH変化と二酸化塩素消費量との関係を図3.22に実線で示した。pH変化量は実験値よりも大きく、酸化の他に塩素化も進行していると考えられる。

生成低分子アルデヒドの測定結果を図3.23に示す。生成量は塩素処理水、オゾン処理水よりは少なかった。また、クロロホルムの生成は認められなかった。

ところで、二酸化塩素処理水をpH 7.2 ± 0.1 に調整したものをそのままCHLに投与すると、試料の細胞毒性が強く染色体の観察が不可能であった。二酸化塩素消費

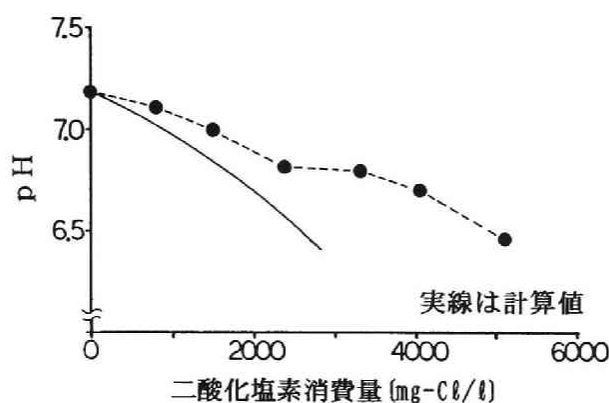


図3.22 二酸化塩素処理におけるpH変化

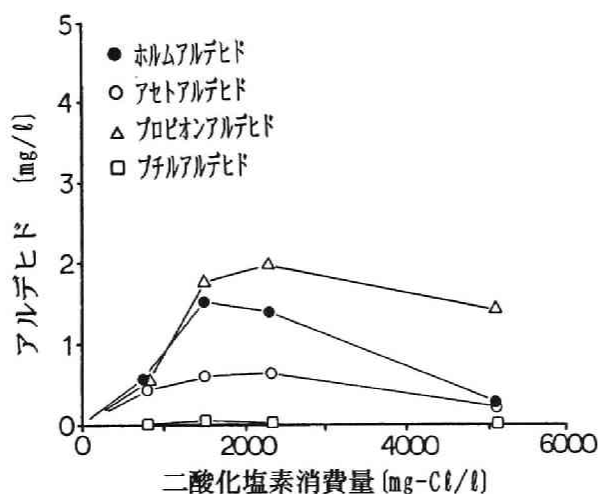


図3.23 二酸化塩素処理による低分子アルデヒドの生成

量4000mg-Cl/lの試料を希釈し、CHLに投与して培養した後、ガラス面に付着している細胞（生育細胞）を計数した結果を図3.24に示す。この結果、二酸化塩素処理水は強い細胞毒性をもつことがわかった。細胞毒性が弱まって染色体の観察が可能となる希釈倍率では、染色体異常誘発性もみられなかった。一般に、二酸化塩素の酸化反応では、(7)式のように亜塩素酸イオン (ClO_2^-) が生成する。本実験における二酸化塩素処理水中の ClO_2^- を測定¹⁵⁾した結果を図3.25に示す。この ClO_2^- の細胞毒性を調べるため、 NaClO_2 をpH7.3リン酸緩衝液に溶解したものをCHLに投与する実験を行った。結果を図3.26に示す。培養液中の ClO_2^- 濃度が7.8mg-Cl/l以上では染色体の観察が不可能になった。図3.24の実験における、希釈前の試料水中

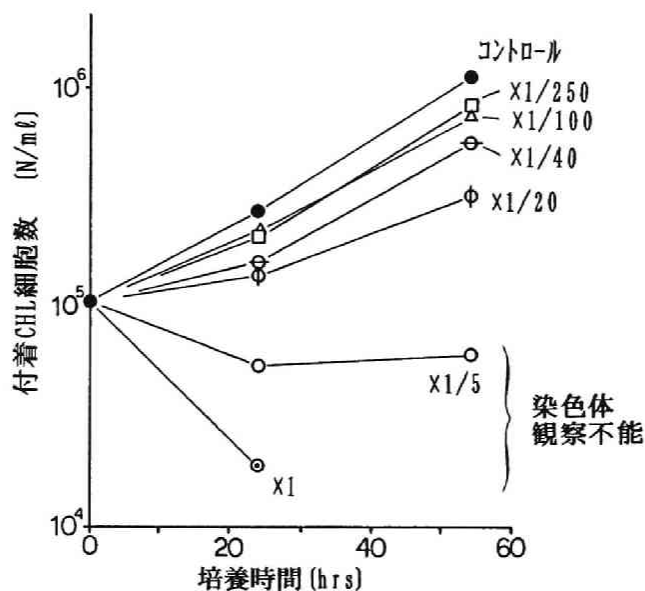


図3.24 二酸化塩素処理水の細胞毒性

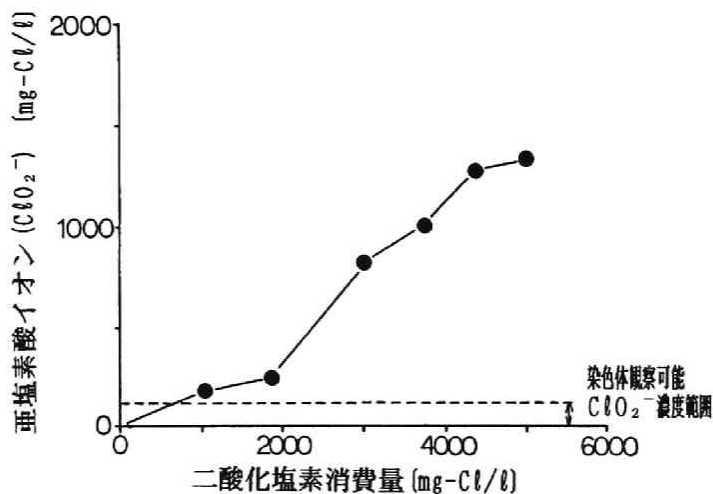


図3.25 二酸化塩素処理に伴う亜塩素酸イオンの蓄積

の ClO_2^- 濃度は、CHL投与時において 880mg-Cl/l （培養液中ではこの $1/10$ ）であり、試料水中の ClO_2^- 濃度と細胞毒性とが図3.24と図3.26とで似ていることから、二酸化塩素処理水の細胞毒性の大部分は ClO_2^- に起因すると推測している。

ところで ClO_2^- も弱いながら酸化力を有する（第1章表1.4参照）ので、水中で物質と反応し、徐々に減少していくものと考えられる。二酸化塩素処理後の経過時間と ClO_2^- 濃度変化を図3.27(1)(2)に示す。染色体の観察が可能な ClO_2^- の培養液中濃度は図3.26より 5.5mg-Cl/l であり、試料中濃度が 55mg-Cl/l 以下になれば染色体異

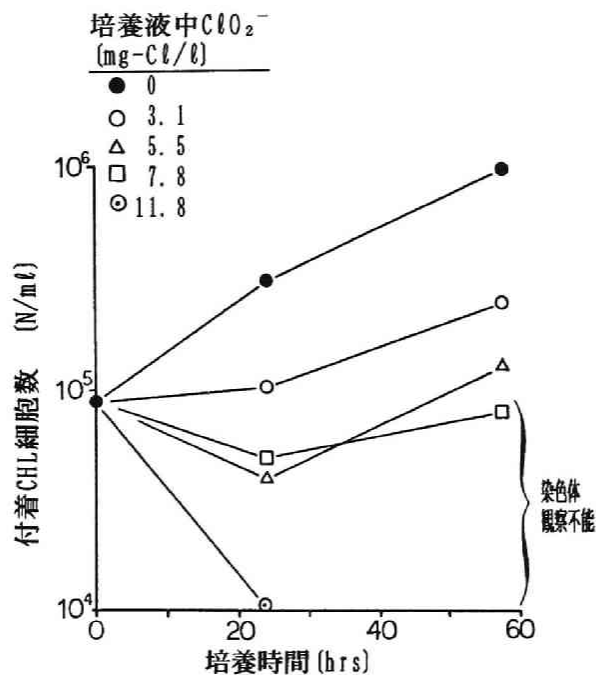


図3.26 亜塩素酸イオンの細胞毒性

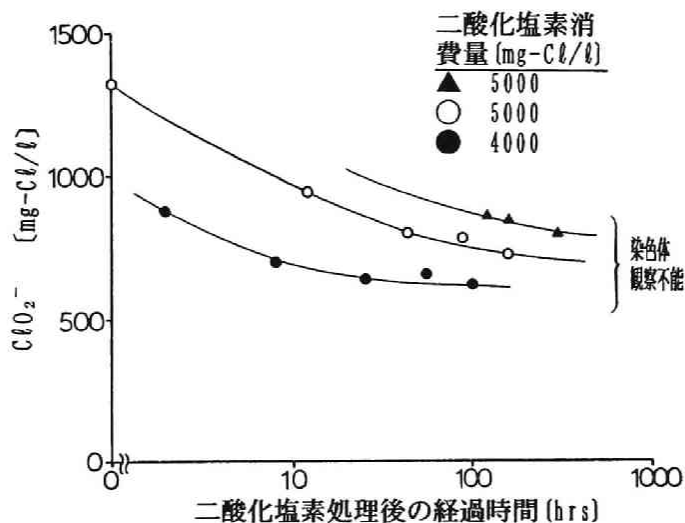


図3.27 (1) 亜塩素酸イオンの残留性

常試験が可能である。二酸化塩素処理水を6日間放置した試料の染色体異常試験結果を図3.28に示す。結果的に二酸化塩素消費量1850mg-Cl/lまでの試料の試験を行い、染色体異常誘発性を検出することができた。なお、図3.29に示すように、 ClO_2^- にも染色体異常誘発性はわずかに認められるが、図3.28にみられる染色体異常誘

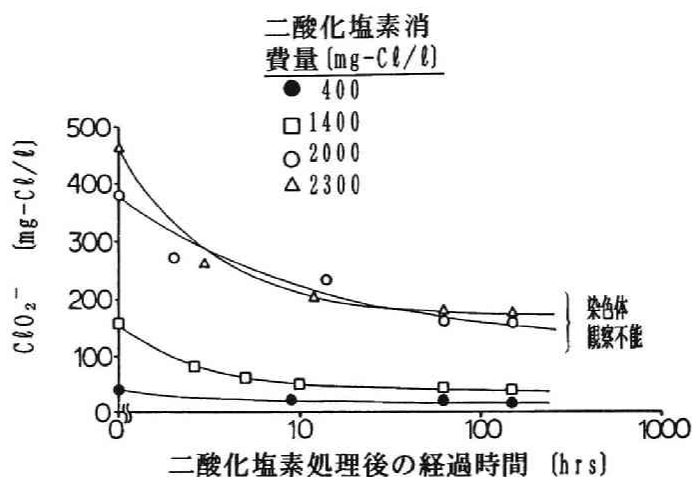


図3.27(2) 亜塩素酸イオンの残留性

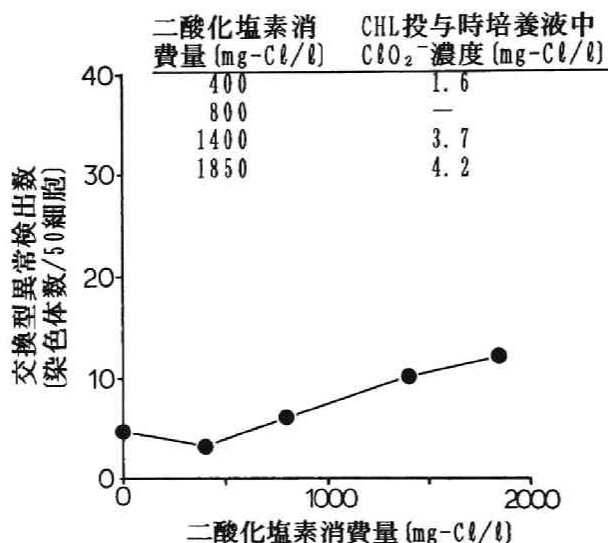


図3.28 二酸化塩素処理水の染色体異常誘発性

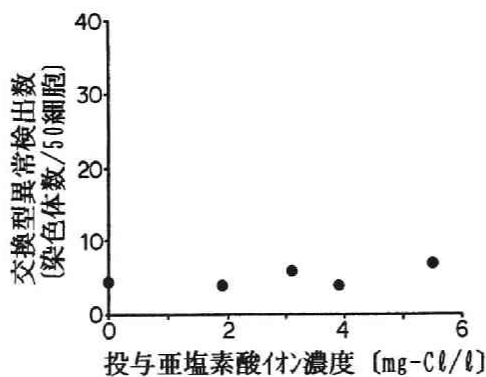


図3.29 亜塩素酸イオンの染色体異常誘発性

表3. 7 二酸化塩素処理水の
エーテル抽出前後の水質

	pH	E ₂₆₀	ClO ₂ ⁻ (mg-Cl/l)
抽出前	6.42	6.5	780
抽出後	6.61*	0.52	0

二酸化塩素消費量5000mg-Cl/lの試料の抽出前後の水質。*は、自然風乾後の残渣を蒸留水で溶解したときのpH。CHL投与試料はpH7.2リン酸緩衝液に溶解した。

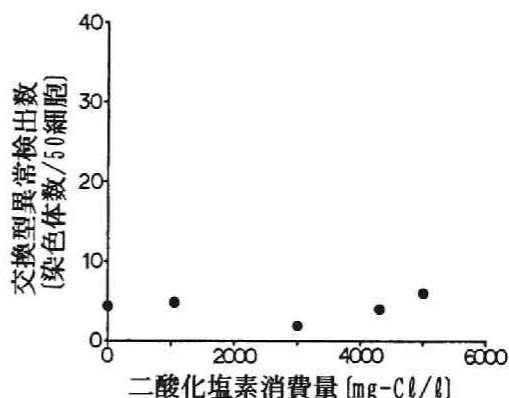


図3. 30 二酸化塩素処理水のエーテル抽出成分の染色体異常誘発性

発性のほとんどはClO₂⁻以外の副生成物によるものと考えることができる。また、測定された低分子アルデヒド(図3. 23)の寄与はほとんどないと考えられる。

ClO₂⁻の影響を除去するため、二酸化塩素処理水をジエチルエーテルで抽出し、自然風乾させた残渣を、pH7.2リン酸緩衝液で再溶解したものを試料として染色体異常試験を行った。表3. 7にジエチルエーテル抽出前後の水質を示した。このように、ClO₂⁻の影響はなく二酸化塩素消費量5000mg-Cl/lまでの試験が行えたが、図3. 30に示すように染色体異常誘発性を検出することはできなかった。

3. 2 まとめと考察

まず、以上行った各消毒処理水の染色体異常試験結果をまとめて図3. 31に示す。横軸は消毒剤の消費量をmg-Cl/lまたはmg-O₃/lで表示してある。実際の琵琶湖水における消毒剤消費量と染色体異常誘発性については、本実験では過マンガン酸カリウム消費量でみて約420倍に濃縮したものを試料としていることから、図3. 31の420mg/lの位置が、実際の琵琶湖水に消毒剤1mg/lを消費させた場合に対応するとみなすことにより、染色体異常誘発性の大小関係を比較しうる。実際の消毒剤注入範囲が0.5mg/l~5mg/lの範囲であるとすれば、図3. 31では、210mg/l~2100mg/lの範囲で大小比較を行えばよい。ただし図3. 31は、本章で行った染色体異常試験の結果をまとめたという段階であり、微生物に対する安全性を含めた消毒処理水の安全性評価のためには、新たな物差しが必要になる。図3. 31の実験結果を利用した解析および考察は第6章で行うこととし、ここでは実験結果そのものについて述べる。

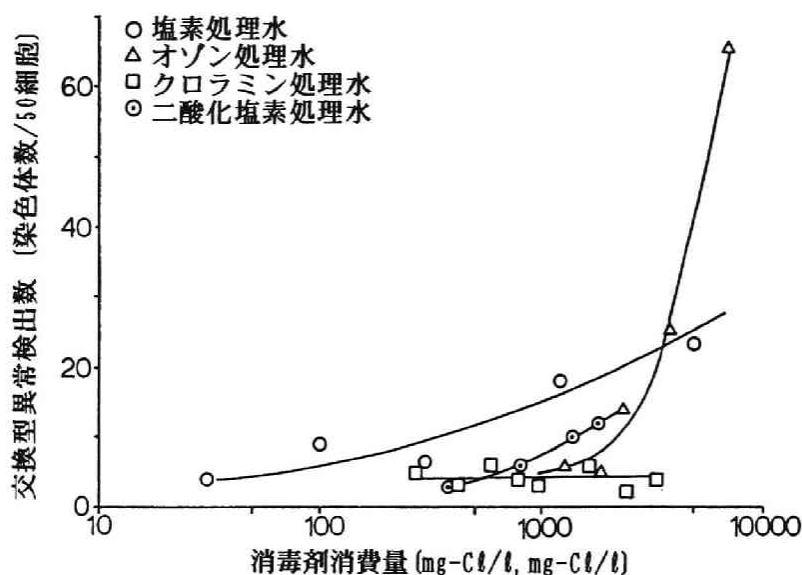


図3.31 消毒処理水の染色体異常誘発性

まず塩素処理水は、低消費量範囲から染色体異常誘発性を有意に認め、4種の中では最も強いといえる。つぎに二酸化塩素処理水は、塩素処理水よりも弱く、最大でも塩素処理水の1/2程度である。オゾン処理水は、高消費量範囲では塩素処理水以上となっているものの、通常の消毒範囲では、塩素処理水や二酸化塩素処理水よりも染色体異常誘発性は弱いと考えてよいであろう。またクロラミン処理水の染色体異常誘発性は認められない。

すなわち消毒処理水の染色体異常誘発性は、通常の消毒処理範囲では、塩素処理水が最も強く、ついで二酸化塩素処理水、オゾン処理水の順であり、クロラミン処理水の染色体異常誘発性が最も弱いといえる。

第1節で述べたように、4種の消毒処理水の変異原性を比較すると、塩素処理水が最も強く、ついでクロラミン処理水、二酸化塩素処理水の順であり、オゾン処理水が最も弱い結果となることがしばしばある。この際の実験方法は、原水を消毒処理した後、まずXAD-2などの樹脂に通水する。吸着物質を有機溶媒で溶出し、溶媒を減圧濃縮して乾固した後、DMSOなどで再溶解したものを試料とする方法が採られている。この濃縮操作によって回収された化合物名や回収率などは調べられていないのが普通で、消毒処理水の変異原物質のうちどの成分が実際に変異原性試験に供されたか、その成分は消毒処理水の変異原活性の重要な成分であるのかなどは不明

なままである。変異原物質の濃縮方法²⁰⁾については、樹脂吸着法の他に、減圧濃縮法、液々抽出法、逆浸透法などがある。減圧濃縮法は、水中の不揮発性物質の回収には最も収率の良い方法であるが、多量の試料水を処理するには長時間を要するほか、揮発性物質が回収できず、また無機塩濃度の高い濃縮液が得られるため変異原性試験に使用しにくいという欠点がある。液々抽出法は、多量の試料水を処理しにくく、極性物質の抽出率が低く、また濃縮率をあげるために溶媒を蒸発させるので揮発性物質は回収できない。逆浸透法は、多量の試料水を濃縮するには大型装置を必要とし、濃縮率が低く、また低分子極性物質の回収率が低い。またこれらを組み合わせる方法も試みられている²¹⁾が、操作が著しく複雑となる。このように消毒処理水の変異原性試験のための試料の調製方法には、重要な問題点が残されているのが現状である。そこで、水中の親水性物質に関する分析的研究や、水中の変異原活性を適切に測定する方法の開発が求められている²²⁾。

本研究では、4種の消毒処理水の変異原活性を比較するのが目的であるので、濃縮過程での副生成物の回収率の違いには特に注意する必要がある。それは、異なる消毒処理水中には異なる種類の副生成物が含まれると想定されるからであるが、それらを平等に濃縮することは現時点では極めて困難である。そのため本研究では、消毒処理後に濃縮操作を行うことを避け、消毒処理に先立って濃縮操作を行い、消毒処理水をそのまま染色体異常試験の試料としたものである。この手順によれば、副生成物全体の染色体異常誘発性を調べることができ、また、消毒処理水の染色体異常誘発性に対する副生成物の寄与度についても検討を加えることが可能になる。本実験において消毒処理水の染色体異常誘発性は、塩素処理水が最も強く、ついで二酸化塩素処理水、オゾン処理水の順であり、クロラミン処理水の染色体異常誘発性が最も弱いという結果になった。この結果を従来の結果と比較した場合、先に述べた試料調製方法の問題や実験条件に関する情報が不足しているために確かなことは指摘しにくい、二酸化塩素処理水とオゾン処理水の変異原性が相対的に強い結果となっているのが特徴といえるようである。その理由としては、消毒処理の対象水が異なること、Ames試験ではなく哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験による結果である可能性も否定できないが、やはり変異原性試験のための試料の作製方法の違いによるものと考えられる。すなわち、二酸化塩素処理水とオゾン処理水の変異原性が相対的に強い結果となったのは、従来の、消毒処理後に濃縮する方法では回収できなかった、親水性の副生成物が本実験では試料中に存在するためと推察し

うる。

一方、本実験では、クロラミン処理水の染色体異常誘発性は認められなかったが、これは二酸化塩素処理水とオゾン処理水の染色体異常誘発性が相対的に強かったため、クロラミン処理水の染色体異常誘発性を有意に認めるまでの実験を行っていないだけであると考え。クロラミン処理水の変異原性は、塩素処理水の1/1であるという報告⁷⁾や、半分程度のケースがあるという報告例^{2) 4)}からみて、本実験においても、クロラミン消費量をさらに増大させたり琵琶湖水の濃縮倍率をあげれば、染色体異常誘発性があらわれることも予想される。

本実験方法の問題点は、消毒処理の対象物質が、自然水中物質のうちXAD-2樹脂に吸着しかつジエチルエーテルで抽出可能である疎水性の物質に限られている点である。この点は、エバポレーターによる直接濃縮法や凍結乾燥法を採用すれば改善することはできるが、濃縮時間がはるかに長くなる、無機塩濃度の高い液となるなどの問題が新たに派生し、水中物質をどこまで平等に濃縮できたかという問題点はやはり残り続ける。消毒処理水の変異原性試験における試料作製方法は今後の大きな課題である。

第4節 塩素と代替消毒剤の比較

ここでは各消毒剤の特性をまとめて塩素と比較する。

二酸化塩素について

- 1) 染色体異常誘発性は塩素処理水よりも弱かったが、有意に認められた。
- 2) pHの低下傾向より、酸化に加えて塩素化も進行していると推察された。
- 3) E_{260} 消費量は塩素より小さかった。
- 4) 低分子アルデヒドの生成が認められたが、塩素処理水、オゾン処理水よりは少なかった。またクロロホルムの生成は認められなかった。
- 5) 亜塩素酸イオン (ClO_2^-) が蓄積する結果、処理水の細胞毒性が認められた。

まず、染色体異常誘発性は塩素処理水よりも弱い点で好ましい。しかし、処理水に別の毒性が加わる点に注意が必要になる。 ClO_2^- の他、少量生成していると思われる^{2,3)} 塩素酸イオン (ClO_3^-)、さらに ClO_2 とあわせて、米国EPAは飲料水中のこれらの残留量の合計を0.5mg/l以下に制限することを提唱している^{2,4)}。すでに指摘

されていることではあるが、二酸化塩素処理ではこれらの無機副生成物の管理の必要性が確認される。

クロラミンについて

- 1) 処理水による染色体異常の有意な生成は認められなかった。
- 2) pHの上昇傾向より、塩素化が中心に進行していると推察された。
- 3) E_{260} 消費量は最も小さかった。
- 4) ホルムアルデヒドのみが定量され、他の低分子アルデヒドの生成量は痕跡量であった。またクロロホルムの生成も認められなかった。

本実験における湖水の濃縮倍率、クロラミン消費量の範囲では染色体異常誘発性を認めなかった点が注目される。

オゾンについて

- 1) 染色体異常誘発性は、低消費量範囲では認められないが、高消費量範囲では塩素処理水以上となった。
- 2) E_{260} 消費量は塩素より小さかった。
- 3) 低分子アルデヒドの生成が認められたが、それらの染色体異常誘発性に対する寄与はほとんどないと考えられた。

図3.31における消費量420mg/lが実際処理での1mg/lに対応することから、消毒に使用する範囲では、塩素と比較して染色体異常誘発性は低くおさえられると考えられる。一方、高注入率範囲で増大する点が注目され、消毒ではなく他の用途に、オゾンを高注入率で使用する時注意が必要である。

第5節 結 語

濃縮した琵琶湖水を4種の消毒剤を用いて処理し、その処理水の染色体異常誘発性を比較検討した。消毒処理に先立って濃縮操作を行ったことで、副生成物全体の染色体異常誘発性を調べることができ、また染色体異常誘発性に対する副生成物の寄与度についても1、2の考察を行うことができた。ここに結果を要約する。

各消毒処理水の染色体異常誘発性について、

- ①塩素処理水は低塩素消費域から染色体異常誘発性を有意に認め、4種のうちでは最も強かった。

②二酸化塩素処理水については、まず染色体異常誘発性は塩素処理水よりも弱く好ましいといえた。しかし、亜塩素酸イオン (ClO_2^-) が蓄積する結果細胞毒性が認められ、無機副生成物の監視は怠れないと考えられた。

③クロラミン処理水は、本実験における琵琶湖水の濃縮倍率、クロラミン消費量の範囲では染色体異常誘発性は認められなかった。

④オゾン処理水は、低消費量範囲では染色体異常誘発性は認められないが、高消費量範囲では塩素処理水を上回る点が特徴であり、消毒ではなく他の用途にオゾンを高注入率で使用する時注意が必要であると考えられた。

結局消毒処理水の染色体異常誘発性は、通常の消毒処理範囲では、塩素処理水が最も強く、ついで二酸化塩素処理水、オゾン処理水の順であり、クロラミン処理水の染色体異常誘発性が最も弱いといえた。

染色体異常誘発性に対する副生成物の寄与について、

⑤副生成物としてクロロホルムと $\text{C}_0 \sim \text{C}_3$ の直鎖低分子アルデヒドを測定し、各消毒処理水の染色体異常誘発性との関係について検討したところ、これらの副生成物はいずれも、消毒処理水の染色体異常誘発性にはほとんど寄与していないことが明らかとなった。

⑥特に、pHを変化させて塩素処理を行った結果、塩素処理水の染色体異常誘発性とクロロホルム生成量とは逆傾向を示した。しかし、塩素によって有機物が酸化された量と染色体異常誘発性とは対応していたことから、他の有機塩素化合物または他の酸化生成物の寄与が示唆された。

なお染色体異常誘発性に対する副生成物の寄与については、付録において詳細に検討する。

参考文献

- 1) Backlund, P., Mutagenic Activity in Humic Water and Alum Flocculated Humic Water Treated With Alternative Disinfectants, Science of Total Environment, Vol. 47, p. 257, 1985
- 2) Meier, J. R. and Bull, R. J., Mutagenic Properties of Drinking Water Dis-

- infectants and By-Products, Water Chlorination : Chemistry, Environmental Impact and Health Effects (Jolly, R. L., et al, editors), Lewis Publishers, Vol. 5, pp. 207-220, 1985
- 3) Zoeteman, B. C. J., Hrubec, J., Greef, E., and Kool, H., J., Mutagenic Activity Associated with By-Products of Drinking Water Disinfection by Chlorine, Chlorine Dioxide, Ozone and UV-Irradiation, Environmental Health Perspectives, Vol. 45, pp. 197-205, 1982
- 4) Lykins, B. W., Koffsky, W. E., and Miller, R. G., Chemical Products and Toxicologic Effects of Disinfection, Journal American Water Works Association, Vol. 78, No. 11, pp. 66-75, 1986
- 5) Kool, H. J. and van Kreijl, C. F., Formation and Removal of Mutagenic Activity during Drinking Water Preparation, Water Research, Vol. 18, No. 8, pp. 1011-1016, 1984
- 6) Cognet, L., Courtois, Y., and Mallevalle, J., Mutagenic Activity of Disinfection By-Products, Environmental Health Perspectives, Vol. 69, p. 165, 1986
- 7) 亀井翼, 丹保憲仁, 金子篤, 遊離塩素, クロラミン及び二酸化塩素処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性, 水道協会雑誌, 第58巻第2号, pp. 21-29, 1989
- 8) 亀井翼, 丹保憲仁, 田村聡志, 塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性, 水道協会雑誌, 第54巻第11号, pp. 25-33, 1985
- 9) 丹保憲仁, 亀井翼, 中津川誠, 塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性(II), 水道協会雑誌, 第56巻第6号, pp. 2-11, 1987
- 10) 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野仁, 長谷川達也, 後藤里花, 浄水処理プロセスにおける変異原性の消長に関する研究, 水道協会雑誌, 第60巻 第6号, pp. 12-20, 1991
- 11) Anderson, W. B., Huck, P. M., Daignault, S. A., Irvine, G. A., Rector, D. W., Savage, E., von Borstel, R. C., and Williams, D. T., Comparison of Drinking Water Disinfectants Using Mutagenicity Testing, Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects (Jolly, R. L., et al, editors), Lewis Publishers, Vol. 6, pp. 201-225, 1990

- 12) Donald, K. D., William, B. A., Susan, A. D., David, T. W., and Peter, M. H., Evaluating Treatment Processes With the Ames Mutagenicity Assay, Journal American Water Works Association, Vol. 89, No. 9, pp. 87-102, 1989
- 13) Bull, R. J., Robinson, M., Meier, J. R., and Stober, J., Use of Biological Assay Systems to Assess the Relative Carcinogenic Hazards of Disinfection By-Products, Environmental Health Perspectives, Vol. 46, pp. 215-227, 1982
- 14) オルガノ, 合成吸着剤アンバーライトXAD
- 15) APHA-AWWA-WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 17th ed., 1989
- 16) 日本薬学会編, 衛生試験法注解, 金原出版, 1990
- 17) 宗宮功, 山田春美, 泉美子, 小田垣正則, 二次処理水のオゾン処理による反応生成物の同定と定量, 水質汚濁研究, Vol. 2, No. 3, pp. 181-189, 1979
- 18) 丹保憲仁編著, 水道とトリハロメタン, 技報堂出版, 1983
- 19) 丸山和博, 速水醇一, 大谷晋一, 児嶋真平, 有機化学序説, 化学同人, 1981
- 20) 浦野紘平, 芳賀伸之, 江本ふで子, 水道水等の変異原性試験方法, 水道協会雑誌, 第57巻第3号, pp. 36-49, 1988
- 21) Monarca, S., Meier, J. R., and Bull, R. J., Removal of Mutagens from Drinking Water by Granular Activated Carbon, Water Research, Vol. 17, pp. 1015-1026, 1983
- 22) Versteegh, J. F. M., Kramers, P. G. N., van Genderson, J., Genotoxicity of Drinking Water Significance and Future Approach, AQUA, Vol. 39, No. 2, pp. 101-106, 1990
- 23) 小沢茂, 相沢貴子, 富沢恒夫, 斉藤実, 真柄泰基, 二酸化塩素処理の反応生成物に関する検討, 水道協会雑誌, 第60巻第4号, pp. 10-18, 1991
- 24) 米国環境保護庁編, 真柄泰基監訳, 飲料水とトリハロメタン, 技報堂, 1983

第4章 大腸菌ファージの不活化に関する実験

本章は、ウイルス汚染の指標として大腸菌ファージをとりあげ、各消毒剤の不活化力と不活化特性について実験的に検討するものである。第1節では、実験に使用した大腸菌ファージが、水道で問題となる腸管系ウイルスと同じ種類に群別できるかについて検討し、第2節では、大腸菌ファージの不活化特性について検討する。

第1節 大腸菌ファージの分離と群別

1. 1 ウイルスとファージの形態¹⁾

主要な動物ウイルス科の粒子形態を分類したものを表4.1に示す。水道で問題となるポリオ (polio) , コクサッキー (coxsackie) , エコー (echo) などの腸管系ウイルスは、ピコルナウイルス (picornavirus) 科に属し、(1) 直径20-30nmの小型球状、(2) 1本鎖RNAをもつ、(3) エンベロープをもたない、などの性状を有する。一方、ファージの粒子形態を分類したものを表4.2に示す。ピコルナウイルス科のウイルスと同じ性状を有するファージはレビウイルス (levivirus) 科と呼ばれ、f2, MS2, Q β などの大腸菌ファージはここに属する。ただし、同じ大腸菌ファージでもT系大腸菌ファージなどは、核酸の種類はDNAで大きさも100nm以上のものもあり、腸内ウイルスの性状とは大きく異なるので注意を要する。

1. 2 宿主菌の単離と同定

宿主菌は、大津市終末処理場流入水を試料とし上水試験方法²⁾にしたがって単離した。複数の単離菌株のうちどれを宿主菌として採用するかは、実際に菌株と流入水とを平板培地上に混釈してブラック (溶菌斑) 形成の有無を調べ、その結果最もブラック数の多かったものを宿主として採用した。この際の大腸菌ファージの検出

表4. 1 主な動物ウイルスの分類¹⁾





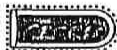








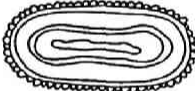






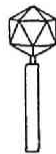






エンベロープをもっていない		エンベロープをもっている		100 nm
一本鎖RNA ビコナウイルス科 (ヒトポリオ1型) 		(+) 鎖RNA トガウイルス科 (シンドビス) 		レトロウイルス科 (ラウス肉腫) 
二本鎖RNA レオウイルス科 (レオ1型) 		(-) 鎖RNA ラウドウイルス科 (水痘性口内炎) 		コロナウイルス科 (トリ伝染性気管支炎) 
一本鎖DNA バルボウイルス科 (キルハムフラット) 		二本鎖DNA ヘルペスウイルス科 (単純ヘルペス) 		オルトミクソウイルス科 (インフルエンザ) 
二本鎖DNA バボウイルス科 (ショープ乳頭腫) 		二本鎖DNA バキュロウイルス科 (核多核体病) 		アレナウイルス科 (リンパ球性脳脊髄膜炎) 
二本鎖DNA アデノウイルス科 (ヒトアデノ2型) 		二本鎖DNA ポックスウイルス科 (ワクシニア) 		
二本鎖DNA イリドウイルス科 (ガガンボイリデッセント) 				

表4. 2 主なファージの分類¹⁾

エンベロープをもっていない		100nm	エンベロープをもっている
一本鎖RNA レビウイルス科 (MS2, QB) 			二本鎖RNA
一本鎖DNA イノウイルス科 (MV-L1型) 		ミクロウイルス科 (φX174) 	
イノウイルス科 (fd型) 			シストウイルス科 (φ6)
二本鎖DNA			二本鎖DNA
			
ミオウイルス科 (P2)	(T2)	スティロウイルス科 (λ, T5)	
			
	バドウイルス科 (T3, 7)	テクチウイルス科 (PRD1)	
			
		コルティコウイルス科 (PM2)	プラズマウイルス科 (MV-L2)

方法をつぎに示す。あらかじめ径10cmペトリ皿に普通寒天培地10mlを入れ、放冷して固めた平板へ、*E. coli*の普通ブイヨン培養液1mlと、0.22 μ mフィルターにて除菌ろ過した試料1mlを注入、さらに半流動普通寒天培地10mlを入れて混釈する（重層寒天法）。試水中に大腸菌ファージが存在すれば、培養中、*E. coli*に感染してこれを溶菌するので、37℃で1晩培養するとブラック（溶菌斑）が形成される。大腸菌ファージ数は、1個のファージ粒子から1個のブラックができるものとみなし、培養の結果生じたブラックの数から計算し、検水1mlあたりに含まれる数としてPFU（plaque forming unit）で表す。

宿主菌の同定のためにまず単離菌株がグラム陰性桿菌であることをHuckerの変法³⁾および検鏡にて確認、ついでオキシダーゼテスト³⁾陰性を確認した。しかる後、BBL社製ミニテック細菌同定システム⁴⁾によって簡易同定試験を行った。グラム陰性桿菌、オキシダーゼテスト陰性、および細菌同定システムにおけるブドウ糖反応陽性、硝酸塩還元試験陽性により単離菌株は腸内細菌とスクリーニングされる。全テスト名と結果を表4.3に示す。この結果、単離菌株は*Escherichia coli*と同定された（確率99.99%）。

1. 3 大腸菌ファージの群別⁵⁾

ここでは分離した大腸菌ファージが腸内ウイルスと同じ種類に属することを確認するための簡単な試験を行う。

大腸菌ファージ試料はつぎのようにして作製した。普通寒天平板培地上の*E. coli*集落を普通ブイヨン培地に移植、同時に別に形成させた大腸菌ファージのブラックを移植して37℃で1晩培養する。しかる後、0.22 μ mフィルターで除菌ろ過した液を試料とする。本液中には大腸菌ファージが1~3 $\times 10^8$ PFU/ml含まれる。

表4. 3 宿主菌の同定試験

テスト名	判定
グラム染色	—
オキシダーゼ	—
マッコンキー	+
クエン酸塩	—
マロン酸塩	—
ONPG	+
フェニルアラニン	—
VP	—
アドニトール	—
アラビノース	—
嫌気アルギニン	—
ブドウ糖	+
硝酸塩還元	+
嫌気H ₂ S	—
インドール産生	+
イノシトール	—
乳糖	+
嫌気リジン	+
嫌気オルニチン	+
ラフィノース	+
ラムノース	+
ソルビトール	+
白糖	—
嫌気尿素	—

表4. 4 大腸菌ファージの大きさの推定

メンブランフィルターの孔径	通過した大腸菌ファージの割合
25 nm	19.6 %
50 nm	100 %
100 nm	100 %
220 nm	100 %

(1) 大きさ

メンブランフィルターの通過性によって推定した。被検大腸菌ファージがフィルターに吸着されるのを防ぐために0.5%アルブミン液を通した後、大腸菌ファージ液を通す。ろ液と未ろ過液中の大腸菌ファージ数を測定した結果を表4.4に示す。孔径25nmのメンブランフィルターを約20%の大腸菌ファージが通過しており、分離した大腸菌ファージの大きさはほぼこの付近であると推定できる。

(2) エンベロープの有無

エンベロープを持ったウイルスは、一般に酸、エーテル、クロロホルムのそれぞれに感受性があり、それぞれ以下の処理によって失活する。

酸感受性はつぎの試験による。炭酸水素ナトリウム不含Eagle MEM培養液 (pH3.5) に1/10容の大腸菌ファージ液を入れて3時間室温で静置する。その後、0.01Mトリス-HCl緩衝液でpHを7.2に調整し大腸菌ファージを測定した。エーテル感受性はつぎの試験による。大腸菌ファージ4mlにジエチルエーテル1mlを入れて混釈し4℃で18時間置いた後、空気曝気によりエーテル臭をなくしてから大腸菌ファージを測定した。クロロホルム感受性はつぎの試験による。大腸菌ファージ液2mlにクロロホルム0.2mlを入れて混釈し室温で15分置く。その後遠心分離し上清中の大腸菌ファージを測定した。

分離した大腸菌ファージは以上3つの試験でいずれも耐性を示し、本ファージはエンベロープを持たないと推定された。

(3) 核酸の種類

DNA分解酵素であるDNase (ウシ膵臓由来, 20mg/ml含有, 宝酒造) またはRNA分解酵素であるRNase (ウシ膵臓由来, 10mg/ml含有, ニッポンジーン) によって大腸菌ファージが不活化するかどうかによって核酸の種類を判別した。大腸菌ファージ液0.9mlに緩衝液0.1ml, 分解酵素を入れ、35℃で2時間静置した後大腸菌ファージ数

を測定した。結果を表4.5に示す。DNaseによって不活化せずRNaseによって不活化したことから、本ファージの核酸はRNAであると判断された。

以上の群別試験の結果、分離した大腸菌ファージは腸内ウイルスと同じ種類に群別できるものと推定された。

表4.5 大腸菌ファージ核酸の種類の推定

試料	添加した核酸分解酵素	酵素処理後の大腸菌ファージ数 PFU/ml
コントロール	なし	1200
1	RNase0.2mg	1200
2	RNase4.0mg	0
3	DNase0.2mg	1200
4	DNase4.0mg	1128

第2節 大腸菌ファージの不活化実験

2.1 実験方法

不活化実験はまず緩衝液中で行った。これは、自然水中の有機物、アンモニア性窒素など消毒剤消費物質を含まない系における各消毒剤の特性を比較するためである。

30ml試験管に、pH7.0, 67mMリン酸緩衝液を14mlとり、この中に1.3の方法で作製した大腸菌ファージ液を0.5ml添加した。ここで、大腸菌ファージは有機物に富む普通ブイヨン中に存在するため、その成分が消毒剤を消費する可能性がある点に注意を要する。そこで普通ブイヨンによる塩素消費を調べた。図4.1(1)(2)に結果を示すが、蒸留水500mlに対し普通ブイヨンの混入量が0.005ml程度なら塩素消費は無視しうると判断した。オゾンの消費でもほぼ同様の結果を得た。したがって普通ブイヨン液中に存在する大腸菌ファージは、緩衝液に対して 10^{-5} 容となるように希釈して添加することとし、この結果、不活化実験の初期大腸菌ファージ数は $1\sim3 \times 10^3$ PFU/mlとなった。

つぎに各消毒剤（すべて水溶液）0.5mlを所定の濃度になるように添加した。各消毒剤の調製方法および消毒剤濃度の測定方法を表4.6にまとめて示す。消毒剤添

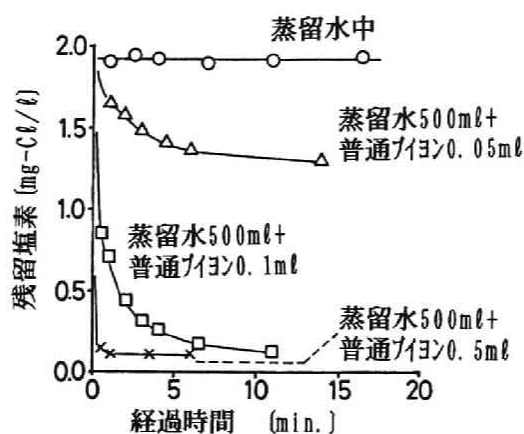


図4.1 (1) 普通ブイオンによる塩素消費

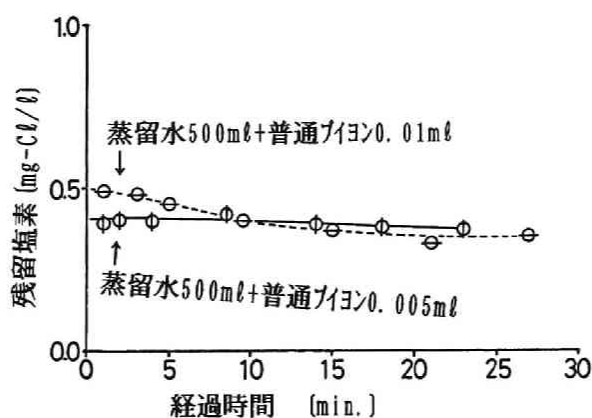


図4.1 (2) 普通ブイオンによる塩素消費

表4.6 消毒剤の調製方法と濃度測定方法

消毒剤	調製方法	濃度測定方法
塩素	次亜塩素酸ナトリウム液を蒸留水で希釈	D P D 滴定法 ⁶⁾
二酸化塩素	亜塩素酸ナトリウム (NaClO ₂) に希硫酸を添加し発生する二酸化塩素を蒸留水中に捕集 ⁶⁾	D P D 滴定法 ⁶⁾
クロラミン	塩化アンモニウム溶液 (pH10) に次亜塩素酸ナトリウム溶液 (pH10) を添加, 混和してモノクロラミン生成 (青木の方法 ⁷⁾)	D P D 滴定法 ⁶⁾
オゾン	オゾン (三菱オゾンOS-1N-A使用) を蒸留水中に曝気したもの	ヨウ素反応—吸光光度法 ⁸⁾

加後、速やかに栓をして転倒して混合し、不活化を開始させた。その後は室温で静置した。所定時間経過後、 10^{-4} Nチオ硫酸ナトリウムを共存させて不活化を停止し、大腸菌ファージを測定した。チオ硫酸ナトリウムの大腸菌ファージへの影響を調べた結果を図4.2に示す。チオ硫酸ナトリウムを含むリン酸緩衝液に30分接触させた後、大腸菌ファージ数を測定したものである。結果として0.02Nまでのチオ硫酸ナトリウムの共存が大腸菌ファージに影響を及ぼさないことを確認した。

pHを変えた不活化実験は、所定のpHの67mMリン酸緩衝液を作製して行った。大腸菌ファージに対するpHの影響を調べた結果を図4.3に示す。所定のpHのリン酸緩衝液に30分接触させた後、大腸菌ファージ数を測定したものである。結果としてpH4.7~9.3の範囲ではpHによる影響はみられなかった。また、pH3.5でも耐性をもつことを1.3で確認している。アンモニア性窒素を共存させた不活化実験は、所定量の塩化アンモニウムを含む緩衝液をまず作製した後、同様に不活化実験を行った。

また、自然水（琵琶湖水）中有機物質が共存する条件下での大腸菌ファージ不活化特性を把握するため、濃縮琵琶湖水の希釈水中での不活化実験を行った。濃縮湖水は第3章表3.4に示したのと同じものを使用し、これを、 KMnO_4 消費量が琵琶湖水と同じになるように蒸留水で450倍に希釈して用いた（ KMnO_4 消費量 3.5mg/l, E_{260} 0.02, pH7.1）。この液中には当然アンモニア性窒素は含まれていない。この中に大腸菌ファージ、消毒剤を添加して同様に不活化実験を行った。

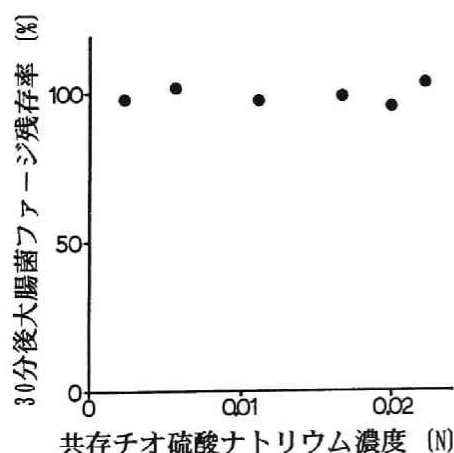


図4.2 チオ硫酸ナトリウムの影響

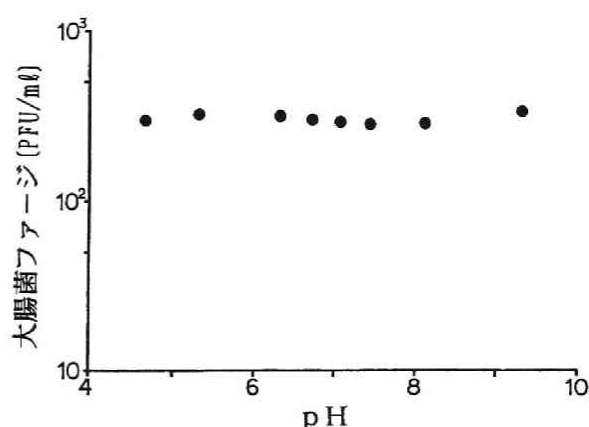


図4.3 大腸菌ファージに対するpHの影響

2.2 実験結果と考察

緩衝液中における、各消毒剤による不活化実験結果の例を図4.4, 4.5, 4.6, 4.7に示す。初期に大きな不活化効果がありその後は緩やかになっているものがあるが、

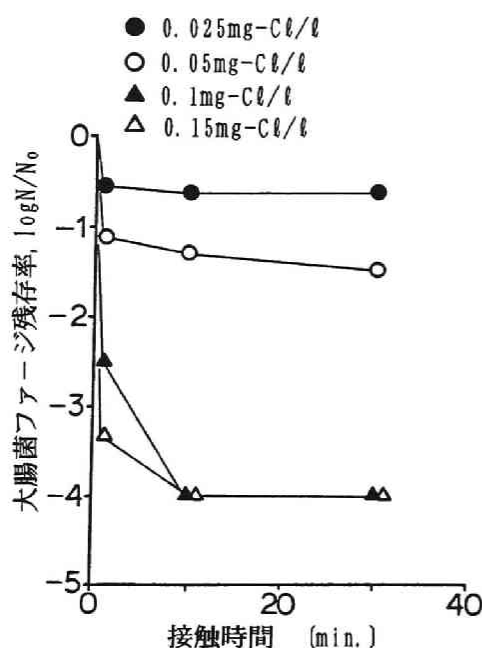


図4.4 塩素による大腸菌ファージの不活化

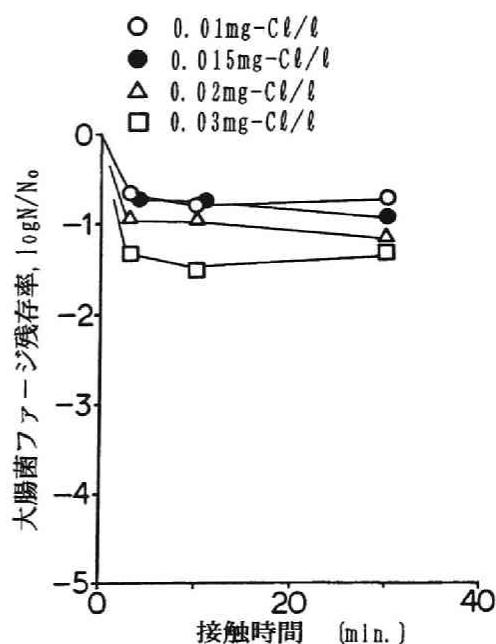


図4.5 二酸化塩素による大腸菌ファージの不活化

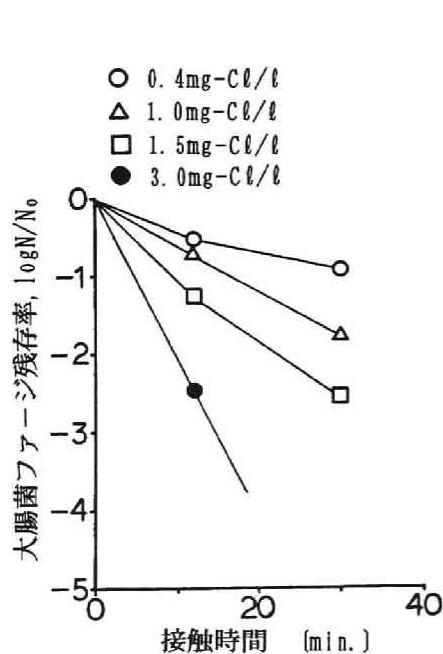


図4.6 クロラミンによる大腸菌ファージの不活化

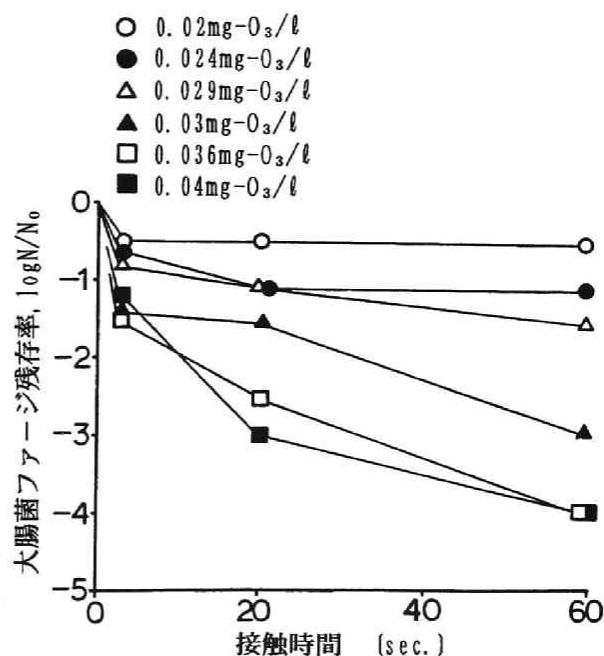


図4.7 オゾンによる大腸菌ファージの不活化

不活化曲線がこのようなテーリングを示す理由としては、①消毒剤の消費、②大腸菌ファージの耐性の分布⁹⁾が考えられる。ここでは、各消毒剤の要求量をゼロにしている実験系で実験を行っていること、比較的少量の消毒剤を添加していることから、消毒剤が消費したためと考えている。一方、クロラミンの場合、反応性が低く消費量自体も少ないため不活化効果が持続しているものと考えている。

各消毒剤による不活化実験結果をまとめたものが図4.8である。実線はアンモニア性窒素を含まず、緩衝液pH7.0、接触時間1分における不活化量を示しており、各消毒剤の不活化力が比較できる。ただし消毒剤の単位は、 $\text{mg-Cl}/\ell$ または $\text{mg-O}_3/\ell$ で表示してある。クロラミンの場合、図4.6に示したように片対数上ではほぼ直線的に不活化が進行したため、1分時における不活化量は計算によって求めた。実験を行った範囲ではオゾンと二酸化塩素がほぼ同じくらいの不活化力を示し、ともに塩素より強い消毒剤であることがわかる。また、クロラミンの不活化力は塩素より2オーダー以上小さいこと、充分な不活化効果を得るにはより多くの添加量またはより長い接触時間が必要であることがうかがえる。

つぎに、pHを変えて不活化実験を行った結果を図4.9に示す。縦軸は消毒剤単位

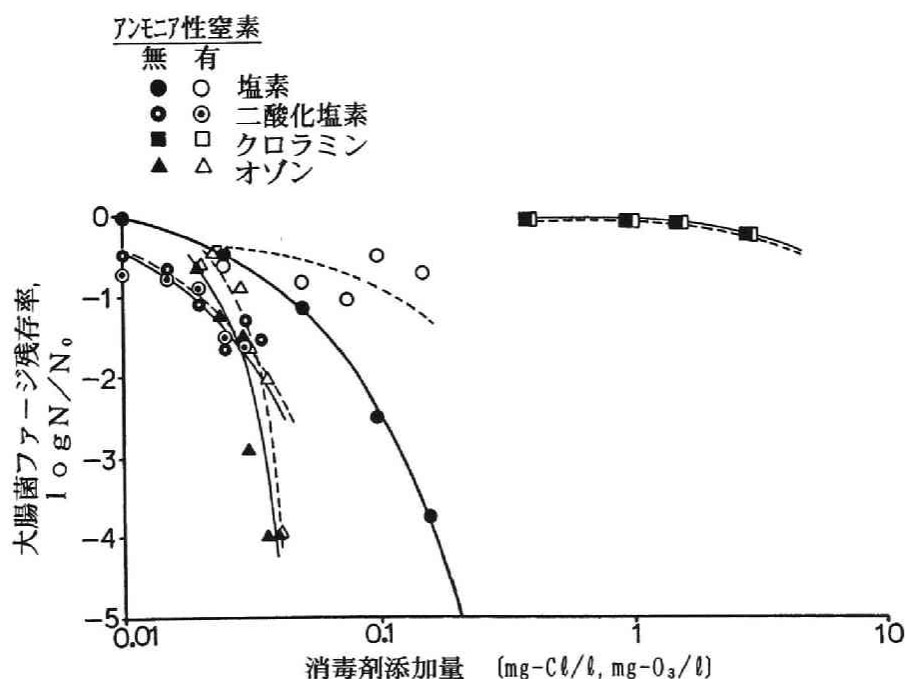


図4.8 各消毒剤による大腸菌ファージの不活化
(接触時間1分)

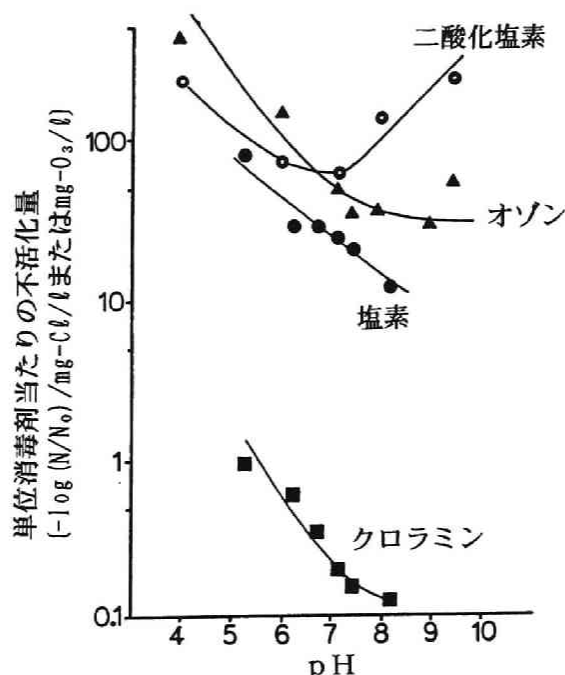


図4.9 大腸菌ファージ不活化に及ぼすpHの影響

濃度当たりの不活化量を表している。

塩素では低pHほど不活化力が大きくなっているが、塩素の消毒力は、pH変化に伴う塩素の HOCl と OCl^- の存在比変化に依存するという従来の結果と一致している。クロラミンも低pHほど不活化力が大きくなっている。その理由としてつぎのことが考えられる。①モノクロラミンの反応性が変化し、その酸化力が低pH側で増大すること（第1章表1.4参照）、②第1章第3節で述べたように、 NHCl_2 の存在比が低pH側で大となること¹⁰⁾。 NHCl_2 は NH_2Cl より不活化力が大きく、大腸菌群に対する不活化効果を比較すると、 $\text{HOCl} : \text{NH}_2\text{Cl} : \text{NHCl}_2 = 1.0 : 0.005 : 0.0166$ であったという例もある¹¹⁾。しかし、②の反応は遅く分単位では進まないのも、主として①の理由と考えられる。二酸化塩素は、中性で最も不活化力が小さく、酸側およびアルカリ側で不活化力が大きくなっている。実験したpH範囲では二酸化塩素の分子形態は不変と考えられ¹⁰⁾、このpH影響の理由ははっきりしない。オゾンの不活化力は、酸性側で大きく中性からアルカリ側で小さいという結果になっている。一般に、有機物のオゾン酸化では、高pHほど酸化反応に関わる OH ラジカルの割合が大きくなるので、酸化が促進されるが、この結果はその逆である。一般の有機物とは異なるこの反応性を確認するためつぎの実験を行った。まず、 OH ラジカルのスカベンジャーで

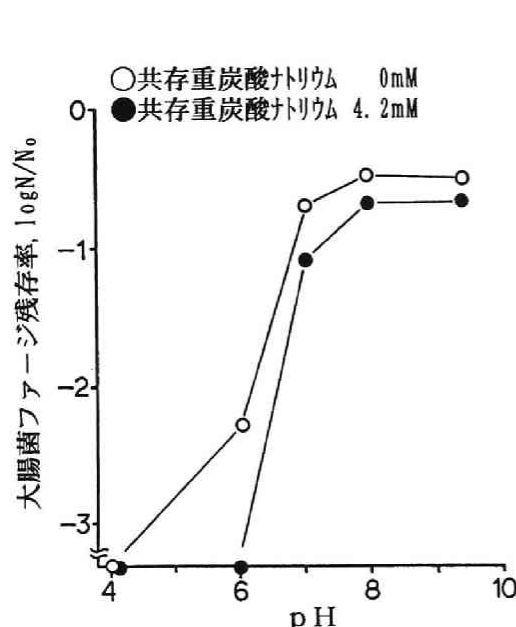


図4.10 オゾン不活化における重炭酸ナトリウム共存の影響
オゾン添加量0.025mg-O₃/ℓ
接触時間20sec

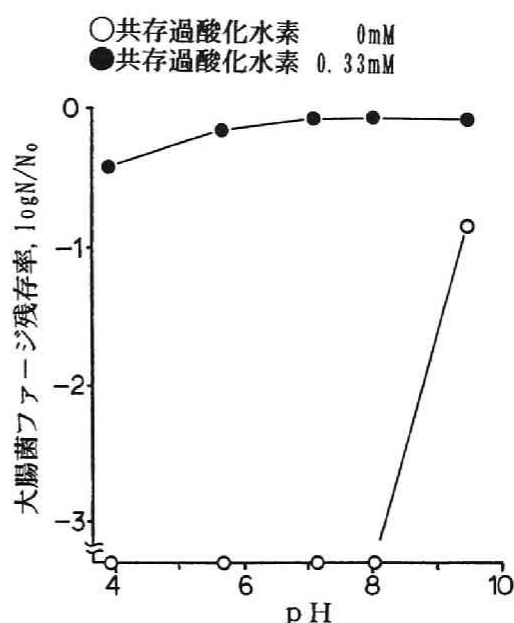


図4.11 オゾン不活化における過酸化水素共存の影響
オゾン添加量0.073mg-O₃/ℓ
接触時間60sec

ある重炭酸ナトリウムを共存させて不活化を行ったところ、図4.10に示すように、重炭酸ナトリウム共存下でO₃の存在割合を増大させた方がより不活化が進行した。また、プロモーターとして過酸化水素を共存させて不活化を行ったところ、図4.11に示すように、過酸化水素存在下でOHラジカルの生成を促進させると不活化が抑制されるという結果が得られた。これらはいずれも通常の有機物に対するオゾン酸化反応¹²⁾とは逆の結果であるが、微生物の不活化実験ではしばしば報告されている¹³⁾。Harakehら¹⁴⁾は、OHラジカルよりもO₃の直接反応によってより不活化されやすい可能性を指摘しているが、不明な点も多く詳しい検討が必要である。

図4.9では全体として、二酸化塩素以外の3種についてはpHが高くなるにつれて不活化力が低下しているのに対し、二酸化塩素の不活化力は中性付近で最も小さく酸、アルカリ側で大きくなる点、アルカリ側に傾くほど二酸化塩素が最も強力となる点が特徴である。

pH7においてアンモニア性窒素が0.5mg-N/ℓ共存する条件下で不活化実験を行った。結果を図4.8中の破線で示す。塩素の場合、周知のように遊離塩素が結合塩素生成反応に消費されるために不活化効果は大きく減退した。オゾンの場合、アルカリ側

ほどアンモニア性窒素と反応することが知られており¹⁵⁾、その結果わずかに不活化効果は減退したようである。一方、二酸化塩素とクロラミンはアンモニア性窒素の影響を全く受けず、アンモニア性窒素の存在とは無関係に消毒処理が行える点で有利であることがわかる。二酸化塩素とクロラミンの場合、混在する遊離塩素が微生物の不活化や有機物との反応に寄与する可能性が指摘されることがあるが、本実験結果から、その寄与は僅かであり反応の主体は二酸化塩素そのもの、クロラミンそのものであることがわかる。

琵琶湖水中有機物が共存する条件下での不活化実験結果を図4.12に示す。実線が有機物共存下での結果であり、破線の緩衝液中での結果と比較して示してある。緩衝液中の不活化効果に比べて、オゾンでは不活化効果が大きく低下、二酸化塩素ではやや大きく低下、塩素では少し低下、クロラミンではほとんど低下しなかった。全体として、消毒力ひいては酸化力が強いものほど有機物ともよく反応し、その結果、大腸菌ファージの不活化効果が大きく低下する傾向にあるといえる。この結果、有機物共存下での大腸菌ファージ不活化効果は、二酸化塩素が最も強く、ついで塩素、オゾン、クロラミンの順となった。この結果から、消毒剤の消費、残留と不活化効果との関係がつぎの主たる関心事となるが、これについては第6章で詳しく

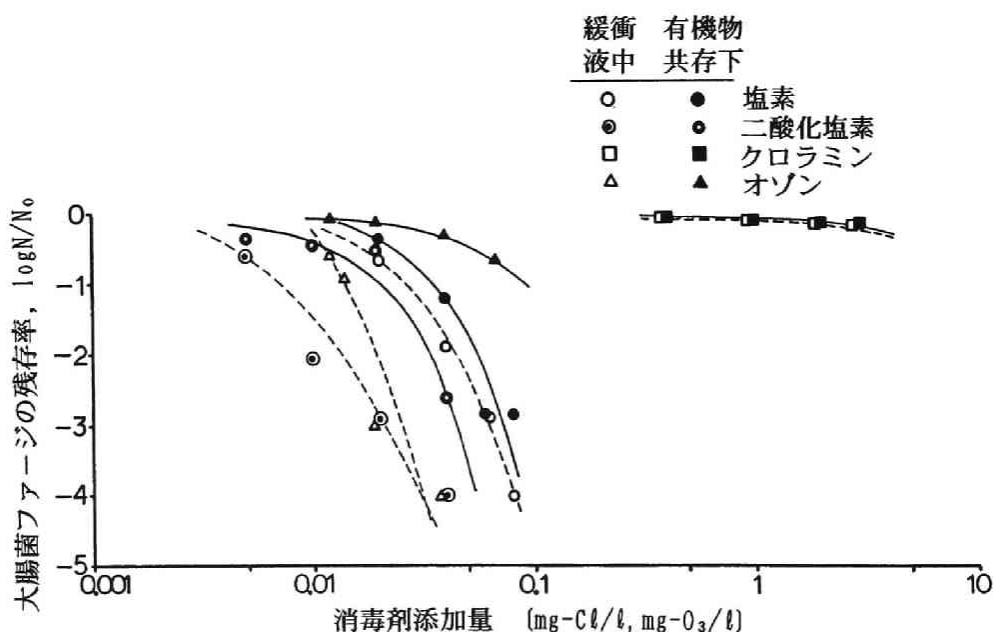


図4.12 有機物共存下における大腸菌ファージの不活化
(接触時間1分)

検討する。

本研究でとりあげた4消毒剤を用いた微生物の不活化実験の例は多い。細菌とウイルスの不活化実験の例を表4.7に示す¹⁶⁾。また、自然水中において種々の微生物の不活化実験を行った例を表4.8に示す¹⁷⁾。これらの結果と比較するために、緩衝液中と自然水中有機物共存下で不活化実験を行った図4.12の結果から、 $C \cdot t$ 値 (C : 注入消毒剤濃度 (mg/l), t : 99%不活化に要する接触時間 (min)) を求めたものを表4.9に示す。ただし表4.7, 表4.8と比較するために、二酸化塩素とクロラミンについては、それぞれ ClO_2 , NH_2Cl の重量として表示した。

まず表4.7から、緩衝液中での不活化力は、オゾンが最も大きく、ついで二酸化塩素、塩素の順で、クロラミンの不活化力が最も小さいというのが一般的な結論である。これを表4.9と比較すると、 $C \cdot t$ 値の大小関係より従来と同じ結果が得られている。本実験では、リン酸緩衝液の消毒剤に対する要求量をゼロにしていないこと、 C の値は残留濃度ではなく注入濃度をとっていること、という制約はあるが、 $C \cdot t$ 値そのものを比較すると、オゾンの0.020は、ほぼ報告されている範囲内といえる。二酸化塩素の0.026は、表4.7では0.03以下、0.04以下の例もあるが、従来の結果よりもやや小さく不活化されやすかったようである。塩素の0.045も小さい値である。さらに、クロラミンの58は、従来の結果よりも非常に小さい値であり、本実験で用いた大腸菌ファージはクロラミンによって不活化されやすかったといえる。

一方、実際の消毒処理の場合を考えた場合には、有機物共存下での不活化力を調べる必要がある。表4.8には、複数の生物種に対する不活化効果が示されている。この結果では、どの生物種に対してもオゾンの不活化力が最も強いことがわかる。クロラミンの不活化力は最も弱い、ウイルスに対して特に弱い。また二酸化塩素と塩素の不活化力を比較すると、poliovirus1に対しては同程度であるが、rotavirusと*E. coli*に対しては塩素の方が強く、逆に、*Giardia lamblia* cysts と *Giardia muris* cystsに対しては二酸化塩素の方が強い結果となっている。そして全体としては、オゾンの不活化力が最も強く、ついで二酸化塩素、塩素の順であり、クロラミンの不活化力が最も弱いと結論している。

本研究において、琵琶湖水中有機物が共存する条件下で大腸菌ファージの不活化実験を行った結果では、表4.9に示したように、塩素と二酸化塩素の不活化効果が最も大きく、ついでオゾンの順で、クロラミンの効果が最も小さい結果となった。

表4. 7 微生物の不活化実験例 (文献16)より抜粋)

消毒剤	微生物種	実験水	残留濃度 (mg/ℓ)	水温 (℃)	pH	接触時間 (min.)	不活化率 (%)	C · t* (min · mg/ℓ)
塩素	<i>E. coli</i>	BDF	0.1	23	10	3.5	90	0.6
	<i>E. coli</i>	BDF, (7μm*	0.5	5	7.0	30	ND	0.9
	<i>E. coli</i>	BDF, >7μm*	0.5	5	7.0	30	ND	2.7
	<i>E. coli</i>	CDF	1.5	4	?	60	ca. 99.9	ca. 2.5
	Human rota-	efflu.	1.1	15	7.2	15	40	>> 15
	Human rota-	efflu.	2.2	15	7.2	10	60	>> 15
	Rota, SAll	BDF	0.1	4	8.0	0.5	99.9	0.03
	Rota, Wa	BDF	0.1	4	8.0	0.65	99.9	0.03
	Rota, SAll	BDF	0.4-0.28	25	10	1.1	99.99	ca. 4.0
	Hepatitis A	BDF	0.42-0.06	25	6	0.7	99.99	ca. 3.0
	Hepatitis A	BDF	0.4-0.28	25	10	2.5	99.99	ca. 5.5
	Hepatitis A	BDF	0.5	5	6.0	6.5	99.99	ca. 1.8
	Hepatitis A	BDF	0.5	5	10	49.6	99.99	ca. 12.3
	Coliphage MS2	BDF	0.5	5	6.0	1.2	99.99	ca. 0.25
	Coliphage MS2	BDF	0.5	5	10	26.5	99.99	ca. 6.9
二酸化塩素	<i>E. coli</i>	BDF	0.3-0.8	5	7.0	0.6-1.8	99	0.48
	<i>Fec. colif.</i>	efflu.	1.9	?	?	10	99.94	ND
	<i>Fec. strep.</i>	efflu.	1.9	?	?	10	99.5	ND
	Polio 1	BDF	0.4-14.3	5	7.0	0.2-11.2	99	0.2-6.7
	Polio 1	efflu.	1.9	?	?	10	99.4	ND
	Rota SAll:							
	dispersed	BDF	0.5-1.0	5	6.0	0.2-0.6	99	0.2-0.3
	cell-assoc.	BDF	0.45-1.0	5	6.0	1.2-4.8	99	1.0-2.1
	cell-assoc.	BDF	0.46-0.52	5	10	0.3-0.4	99	0.16-0.2
	Hepatitis A	BDF	0.14-0.23	5	6.0	8.4	99	1.7
	Hepatitis A	BDF	0.2	5	9.0	(0.33)	> 99.9	(0.04)
	Coliphage MS2	BDF	0.15	5	6.0	34	99	5.1
	Coliphage MS2	BDF	0.15	5		(0.33)	> 99.95	(0.03)
クロラミン	<i>E. coli</i>	BDF	1.9-2.2	5	9.0	51-59	99	113
	Polio 1	BDF	5-22	5	9.0	170	99	1420
	Polio 1	tap	0.5	24	7.0-8.2	15	50	ND
	Polio 1	+10%efflu.	0.5	24	7.0-8.2	15	0	ND
	Polio 1	+10%efflu.	2.0	24	7.0-8.2	15	99.7	ND
	Hepatitis A	BDF	10	5	8.0	117	99.99	ca. 592
	Coliphage MS2	BDF	10	5	8.0	>> 60		ca. 2100
	Rotavirus SAll							
	dispersed	BDF	10	5	8.0	366-402	99	4034
	cell-assoc.	BDF	10	5	8.0	570-636	99	6124
オゾン	<i>E. coli</i>	?	0.04-0.07	1	7.2	0.08-0.5	99	0.006-0.02
	Tot. colif.	efflu.	5.0	12.6	7.1	18	99.89	ND
	Fecal strep.	efflu.	5.0	12.6	7.1	18	99	ND
	Polio 1	BDF	0.15-0.2	5	7.2	0.4-1.5	99	0.2
	Polio 2	BDF	0.15	25	7.2	4.83	99	0.72
	Rota SAll	BDF	0.1-0.3	4	6.0-8.0	0.12-0.19	99	0.019-0.064
	Human rota	BDF	0.05-0.3	4	6.0-9.0	0.12-0.19		0.006-0.036

BDF: 要求量のない緩衝液, CDF: 塩素要求量のない水, efflu.: 下水処理水,

*C: 残留濃度 (mg/ℓ), t: 99%不活化に要する接触時間 (min.),

* (7μm: 7μmより小さな粒子に吸着したもの, >7μm: 7μmより大きな粒子に吸着したもの)

表4. 8 微生物の不活化実験におけるC・t値¹⁷⁾

微生物	遊離塩素 pH6-7	クロラミン pH8-9	二酸化塩素 pH6-7	オゾン pH6-7
<i>E. coli</i>	0.034-0.05	95-180	0.4-0.75	0.02
Poliovirus 1	1.1-2.5	768-3740	0.2-6.7	0.1-0.2
Rotavirus	0.01-0.05	3806-6476	0.2-2.1	0.006-0.06
Phage ϕ_2	0.08-0.18	ND	ND	ND
<i>Giardia lamblia</i> cysts	47->150	2200 ^(a)	26 ^(a)	0.5-0.6
<i>Giardia muris</i> cysts	30-630	1400	7.2-18.5	1.8-2.0
Cryptosporidium	7200 ^(b)	7200 ^(c)	78 ^(d)	5-10 ^(e)

値は、5℃、99%不活化に対するもの。ただし、*Giardia lamblia* cystsとCryptosporidiumは除く。

^(a) pH6-9, 99.9%不活化に対する値

^(b) pH7, 25℃, 99%不活化に対する値

^(c) pH7, 25℃, 90%不活化に対する値

^(d) pH7, 25℃, 90%不活化に対する値

^(e) pH7, 25℃, 99%不活化に対する値

ND: no data

表4. 9 各消毒剤による不活化実験におけるC・t値

消毒剤	緩衝液中でのC・t* (mg/ℓ・min)	有機物共存下でのC・t* (mg/ℓ・min)
塩素	0.045	0.057
二酸化塩素	0.026	0.063
クロラミン	58	87
オゾン	0.020	0.16

*C: 注入消毒剤濃度(mg/ℓ), t: 99%不活化に要する接触時間(min)

図4.12の結果をもとに求めたもの。塩素、二酸化塩素、オゾンについては図4.12から99%不活化に要する濃度を求めた。クロラミンについては別に接触時間10分の場合のクロラミン注入量と大腸菌ファージ残存率との関係を求め、これより99%不活化に要するクロラミン注入濃度を求めた。

表4.7, 表4.8との比較のため、二酸化塩素とクロラミンについては、それぞれClO₂, NH₂Clの重量として示した。

C・t値を比較すると、塩素の0.057とオゾンの0.16はほぼ報告されている範囲内であるといえるが、二酸化塩素の0.063とクロラミンの87は、いずれも小さい値で、不活化されやすかったといえる。本研究の結果を従来の結果と比較すると、有機物共存下では、オゾンの不活化効果が大きく低下し、塩素よりも小さくなった点が特徴であった。この理由としては、まず、有機物との反応性に富むオゾンが水中で消費された結果、不活化効果が大きく低下したことが考えられる。また、本研究では有機物共存下における不活化実験は、自然水中ではなく、アンモニア性窒素など有機物以外の消毒剤消費物質が存在しない条件下で行ったものである。これは特に

塩素の場合、不連続点塩素処理における不連続点以降の処理を想定しており、4消毒剤が微生物と有機物だけに反応する場合の各消毒剤の不活化力を比較したものである。したがって、アンモニア性窒素の共存が考えられる自然水を対象とした表4.8のような結果と直接比較するのは困難であり、本研究結果（表4.9）では塩素の不活化力は他の消毒剤に対して相対的に大きく評価されている。しかし、オゾンと二酸化塩素の不活化力を比較すると、緩衝液中では、不活化力はオゾン、二酸化塩素が同程度（消毒剤そのものの重量で単位表示した場合）であったものが、有機物共存下ではその差が大きくなっていることから、オゾンの不活化力が大きく低下したのは、やはりオゾンと有機物との反応性が富んでいたものと考えられる。オゾンと有機物との反応性が富んでいた理由としては、琵琶湖水を濃縮する過程で抽出された有機物が、特にオゾンとの反応性に富む物質群であったことが考えられる。しかし、琵琶湖水中のオゾン消費と、濃縮操作によって抽出された有機物によるオゾン消費との比較検討は行っておらず、詳細は不明である。

以下の研究は、オゾンによる消毒において、有機物との反応が消毒力に与える影響を、他の消毒剤と比較して述べている。河原¹⁸⁾は、オゾンの消毒力に関して、塩素に比べて共存物質の影響を受けやすく、下水の2次処理水等の汚水の殺菌には注入量が多くなることを指摘している。実際、2次処理水の場合、オゾンで消毒に用いると必要なオゾン注入量は塩素と同レベル、あるいはより高い注入率となるケースも報告されている。Blankenの研究¹⁹⁾でも、2次処理水の消毒において、塩素の注入量3.65mg/lに対してオゾンは15.3mg/lの注入を行っている。ただし、同じく2次処理水中での微生物の不活化であっても、依然としてオゾンの不活化力が最も大きく、ついで二酸化塩素、塩素の順であるという報告²⁰⁾もある。

以上の考察はすべて消毒剤の重量を基礎にして行ったものであるが、最後に消毒剤の量を当量に換算して実験結果をまとめておく。化学的な見地からは、不活化力の大小は当量をもとに比較する方が妥当であるためである。塩素、二酸化塩素、クロラミン、オゾンの1モルは、それぞれ2当量、1当量、2当量、2当量に相当するので、これより表4.9のC・t値を当量単位に換算したものを表4.10に示す。緩衝液中の値を表4.9と表4.10で比較すると、表4.9では、オゾン、二酸化塩素、塩素、クロラミンの順であったものが、表4.10では、二酸化塩素、オゾン、塩素、クロラミンとなった。当量単位でみた場合には、二酸化塩素が最も強力な消毒剤であるといえる。有機物共存下でのC・t値からも同様の点を指摘しうる。

表 4. 10 各消毒剤による不活化実験における C・t 値 (当量換算)

消毒剤	緩衝液中での C・t* (me/l・min)	有機物共存下での C・t* (me/l・min)
塩素	0.0025	0.0032
二酸化塩素	0.00039	0.00093
クロラミン	2.3	3.4
オゾン	0.00083	0.0067

*C : 注入消毒剤濃度 (me/l), t : 99% 不活化に要する接触時間 (min)
表 4. 9 の値を当量換算したもの。

第3節 塩素と代替消毒剤の比較

ここでは実験で得られた結果から、各消毒剤の特性を塩素と比較して示し、本章のまとめとする。したがって以下の記述は全て塩素と比較した場合についてのものである。

二酸化塩素について

利点

- 1) 実験した全 pH 範囲において塩素より不活化力が大きい。
- 2) 有機物共存下においても塩素より不活化力が大きい。
- 3) アンモニア性窒素と反応しない。

欠点

- 1) 有機物とよりよく反応する。したがって対象水の二酸化塩素要求量をよく把握して注入量をコントロールすることが必要。

クロラミンについて

利点

- 1) 有機物との反応性が低いので消毒剤消費量が少なく、注入量のコントロールがしやすい。
- 2) アンモニア性窒素と反応しない。

欠点

- 1) 不活化力が小さいので短時間での不活化効果は期待できない。

オゾンについて

利点

- 1) アンモニア性窒素の影響が僅かである。

欠点

- 1) 有機物とよりよく反応するので、不活化効果が塩素よりも低下する場合がある。

琵琶湖水中有機物共存下で不活化実験を行った結果では、消毒力ひいては酸化力が強いもののほど有機物ともよく反応し、その結果、大腸菌ファージの不活化効果が大きく低下する傾向にあった。この結果、有機物共存下での大腸菌ファージ不活化効果は、二酸化塩素が最も強く、ついで塩素、オゾン、クロラミンの順となった。

参考文献

- 1) Heinz Fraenkel-Conrat他著，三浦謹一郎他訳，ウイルス学，東京化学同人，1985
- 2) 厚生省監修，上水試験方法1985年版，日本水道協会，1985
- 3) 長谷川武治編著，微生物の分離と同定，学会出版センター，1985
- 4) 米国BBL社，ミニテック細菌同定システム 試験の手引き
- 5) 国立予防衛生研究所学友会編，ウイルス実験学総論，丸善，1973
- 6) APHA-AWWA-WPCF, Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 17th ed., 1989
- 7) 青木豊明，中森洋一郎，藪野肖三，清水秀朗，新谷一夫，梶正一，上水処理過程におけるクロラミンおよび遊離塩素の季節変動，環境科学会誌，3(4)，pp. 261-267，1990
- 8) 日本薬学会編，衛生試験法注解，金原出版，1990
- 9) Thurman, R. B., Gerba, C. P., Molecular Mechanism of Viral Inactivation by Water Disinfectants, Advances in Applied Microbiology, Vol. 33, pp. 75-105, 1988
- 10) White, G. C., Handbook of Chlorination, Van Nostrand Reinhold Company, 1986

- 11) AWWA, Water Quality and Treatment, McGraw-Hill, 1990
- 12) 宗宮功編著, オゾン利用水処理技術, 公害対策技術同友会, 1989
- 13) 大垣眞一郎, 関谷毅史, オゾンの消毒効果, 水質汚濁研究, Vol. 13, No. 12, pp. 17-21, 1990
- 14) Harakeh, M. S., Butler, M., Factors Influencing the Ozone Inactivation of Enteric Viruses in Effluent, Ozone: Science and Engineering, Vol. 6, pp. 235-243, 1985
- 15) 山田春美, オゾンおよび塩素による化学酸化処理に関する研究, 京都大学学位論文, 1987
- 16) Sobsey, M. D., Inactivation of Health-related Microorganisms in Water by Disinfection Processes, Water Science and Technology, Vol. 21, No. 3, pp. 179-195, 1989
- 17) Lykins, B. W., Moser, R., and DeMarco, J., Treatment Technology in The United States: Disinfection and Control of Disinfection By-products, The 2nd Japan-U. S. Governmental Conference on Drinking Water Quality Management, US-4, 1990
- 18) 河原長美, 汚水のオゾン処理に関する基礎的研究, 京都大学学位論文, 1977
- 19) den Blanken, J. G., Comparative Disinfection of Treated Sewage with Chlorine and Ozone, Water Research, Vol. 19, No. 9, pp. 1129-1140, 1985
- 20) Harakeh, M. S., Butler, M., Inactivation of Human Rotavirus SA11 and Other Enteric Viruses in Effluent by Disinfectants, Journal of Hygiene, Vol. 93, pp. 157-163, 1984

第5章 大腸菌の回復と再増殖に関する実験

第1節 本章の目的

一般に自然水中における細菌には、生菌の他に、さまざまなストレスによって正常な増殖能を失っているものがあることが知られる¹⁾。また塩素処理などによってもそれが不完全な場合、すべてが死滅せず、生き残るものもある²⁾。これらの菌は、適当な環境に恵まれさえすれば、もとの正常な状態に回復し増殖しようと考えられている³⁾。

一方、上水消毒に使用する消毒剤には、不活化力が強いことの他に残留性があることが求められる。それは、もし給水過程で消毒効果がなくなれば、新たな再汚染に対応できないなど、飲料水の微生物的安全性が維持できなくなるからであるが、この微生物的安全性には上に述べたような非致死的なダメージ菌およびその回復と再増殖を含めて考える必要がある。そこで本章では、消毒処理やその他のストレスを受けることによって、細胞の一部に非致死的なダメージを生じた菌に着目し、それから残留特性の重要性について考察する。

本章でとりあげている非致死的なダメージを生じた菌とは、上に述べたように、活発な増殖能は失っているものの死んではないという菌である。また、回復とは、非致死的なダメージを生じた菌が増殖能をとりもどし生菌となることを意味する。非致死的なダメージの原因となるストレスの種類としては、凍結、凍結乾燥、加熱、浸透圧ショック、酸性化、飢餓、化学酸化剤による酸化などがあり、これらによってダメージを受けた菌を損傷菌ということもある³⁾。これらの菌に共通して起きている変化として、細胞膜に障害が起こりその選択透過性が失われることが指摘されている^{4) 5)}。したがってそれらの菌は界面活性剤を含む選択培地中では増殖することが困難となる。これより界面活性剤の有無が、非致死的なダメージ菌の存否の判定によく使用される。非致死的なダメージ菌に起きる他の変化としては、代謝活性が低下することである^{6) 7) 8) 9)}。たとえばプロテアーゼ、各種の脱水素酵素、ATP合成系の構成酵素などに活性低下がみられるという。またDNAの高次構造が変化

しDNA鎖の切断が起きている場合もある^{10) 11)}。本研究では、このような非致死
的ダメージ菌に対し、測定上、回復操作を行っている間に選択培地中での増殖能を
獲得する菌を測定することからこれらの菌を回復可能菌ということにする。さらに
再増殖とは、生菌が増殖する過程と、回復可能菌が回復して生菌となりこれが増殖
する過程とを含めて用いる用語である。しかしながら、実際には、以上の用語の意
味する内容を測定方法と対応させて議論することは難しい。したがって本章の第2
節、第3節では実験的事実を述べ、第4節において上記用語の意味する内容を測定
方法と対応させて再整理することにする。

本章では、まず、単離大腸菌を用いて、消毒剤が消費されたとき、実際の給水中
のような貧栄養環境で、回復と再増殖がおきるかについて検討する。ついで、各
消毒剤によって回復の可能性のある菌がどの程度生成するかについて調べる。なお
本章では、単離大腸菌を用いて、その基本的挙動を実験的に調べることを中心とし、
消毒剤の残留特性と回復、再増殖との関係については第6章の中で考察する。

第2節 BGLB培地による再増殖の観察

塩素処理後の生存菌が、自然水中や砂ろ過水中で回復または再増殖しうるかにつ
いて検討するため、つぎの予備実験を行った。

第4章で単離し、同定済みの*E. coli*を用いて実験を行った。TLY寒天培地（TLY液
体培地組成を表5.1に示す）上にコロニーを形成させた*E. coli*を、蒸留水中に浮遊
させた。ついでこの菌液を蒸留水で2回遠心分離洗浄した。遠心条件は、8000rpm，
15分である。これを残留塩素 約 0.4mg-Cl/lを含む水道水中に浮遊させ、ただちに
遠心分離した。同じ操作をもう一度繰り返した。この間に*E. coli*は水道水中の塩素
によってダメージを受ける。しかる後、300ml三角フラスコに琵琶湖水またはその
砂ろ過水を取り、上記の処理を行った *E. coli*を添加して振とうした。BGLB培地（
ブリリアントグリーン乳糖胆汁イオン培地、表5.2）を用いるMPN法によって、経
時的に*E. coli*数を測定した結果を図5.1に示す。

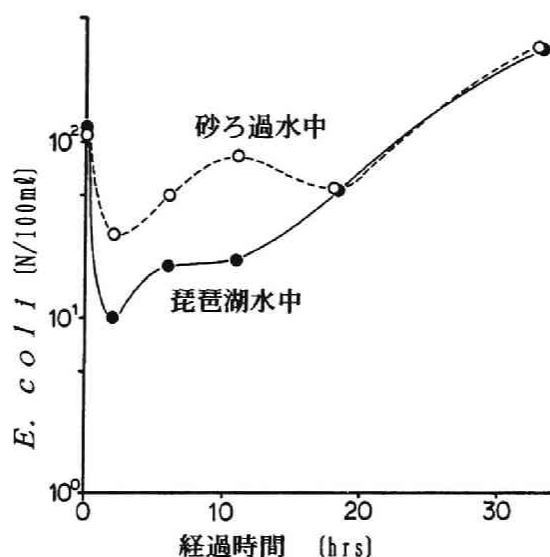
本実験は、塩素処理後の生存菌の回復と再増殖の可能性を予備的に検討したもの
であり、初期菌数や初期菌数に対する生存菌の割合などの測定は省略している。し
かし、図から、塩素処理後に生存する *E. coli*が、残留塩素のない琵琶湖水中また

表5.1 TLY培地

トリプチケース・ソイブロス	30g
カゼインのパンクレアチン消化物	15.0g
大豆のパパイア酵素消化物	5.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸二カリウム	2.5g
ブドウ糖	2.5g
乳糖	10g
酵母エキス	3g
蒸留水	1ℓ

表5.2 BGLB培地 (ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地)

ペプトン	10g
乳糖	10g
乾燥牛胆汁粉末	20g
ブリリアントグリーン	0.0133g
蒸留水	1ℓ

図5.1 塩素ダメージ後の*E. coli*の回復
(BGLB培地によるMPN測定)

はその砂ろ過水中で、回復または再増殖していることがわかる。ただし増殖速度は非常に遅く、経過18時間以後対数増殖期に入ったとみなして世代時間を求めると約5.5時間となる。これは大腸菌 (*E. coli*) の世代時間は13~17分であるといわれること¹²⁾、あるいは実際に栄養物質は豊富な培地中で求められた世代時間 (表5.3¹³⁾¹⁴⁾) と比較すると非常に長い。したがってこの実験では、増殖よりも、非常にゆっくりとした回復現象が卓越しているものと推察できる。しかしこの結果は、給配水系統で塩素が消費されれば、残存する菌が実際に再増殖する可能性を示唆するものである。またそれが大腸菌群検査法の1つであるBGLB培地を用いた方法で観察できるといえる。

表5. 3 *E. coli*の世代時間測定例

微生物名	世代時間 (分)	文献
<i>E. coli</i>	15 ^a	13
<i>E. coli</i> AJ2589	34.5~42 ^b	14
<i>E. coli</i> AJ2590	63~70 ^b	14
<i>E. coli</i> AJ2598	27~30 ^b	14
<i>E. coli</i> AJ2603	24~27 ^b	14

^aトリプティカーゼ培地使用, 30℃^b10倍希釈ブイヨン培地使用, 30℃

第3節 TLY寒天培地による回復, 再増殖の観察

3. 1 測定方法について

ここでは図5.1で観察されたことをさらに詳細に検討する。この際、本研究では単離した*E. coli*を用いているので、BGLB培地を用いたMPN法を用いる必要は必ずしもなく、より簡便な寒天培地法で測定する。

ところで、BGLB培地は、大腸菌群を測定するための選択培地である。特にこの中に含まれる牛胆汁は、界面活性作用を有し雑菌の生育を抑える効果があることから、微生物の選択分離培地によく用いられ、特に水や汚泥などから大腸菌を選択的に分離培養するのに広く用いられているものである¹⁵⁾。

一方、凍結、乾燥、加熱などの処理で生じた非致死のダメージ菌は、トリプチケース・ソイブロスのような液体培地（非選択培地）や脱脂乳、あるいはアミノ酸、ブドウ糖、リン酸などを含む溶液中に30分ないし数時間保温すると、元の正常状態に復帰し、たとえば選択阻害剤に対する抵抗性をとりもどす³⁾。非致死のダメージ菌を検出するための基本的考え方は、試料水中の非致死のダメージ菌が選択培地と接触する前に、非選択培地で回復させておくことである。この方法に関する検討は食品微生物の分野で進んでおり、一例として、試料（適当に希釈したもの）をトリプチケース・ソイ寒天（またはプレートカウント寒天など）に混釈または塗抹し、25~30℃で1~2時間保持したのち、たとえばバイオレットレッド胆汁寒天を重層して大腸菌群を計測する方法がある。この方法で市販食品に含まれる大腸菌群数を測定したところ、直接バイオレットレッド胆汁寒天で測定した場合よりもトリプチケース・ソイ寒天で回復後バイオレットレッド胆汁寒天を重層して測定した場合の

表5.4 河川水中に放置した*E. coli* C320MP25 を選択培地あるいは非選択培地で計数した場合の比較¹⁷⁾

放置時間 (日)	細胞検出率, % ^a								
	寒天混釈法			MPN法			メンブランフィルター法		
	TSY	DLA	VRB	TSY	LAC	BGB	TSY	m-Endo	m-FC
0	100.0	93.8	93.8	137.5	137.5	106.3	106.3	106.3	87.5
1	100.0	96.8	87.3	174.6	125.4	125.4	93.7	42.9	22.2
2	100.0	3.5	1.5	65.0	85.0	16.5	95.0	0.3	0.3
3	100.0	0.1	0.1	159.1	159.1	5.9	131.8	0.1	0.0

^aTSY寒天混釈法で得られた値に対する百分率

TSY:トリプチケース・ソイ+0.3%酵母エキス+0.5%ブドウ糖, DLA:デオキシコール酸塩培地, VRB:バイオレット・レッド胆汁培地, LAC:乳糖培地, BGB:ブリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地

方が、1.7倍～33倍の測定値が得られたという³⁾。回復操作に適した培養基の組成についてこれまでに行われた検討の結果、ペプトンとしてカゼインのパンクレアチン分解物を含むトリプチケース・ソイが良好な結果となることが多い。McFetersらは、飲料水の給水過程で発生するダメージを受けた大腸菌群を回復させるための培地として、トリプチケース・ソイに酵母エキスと乳糖を添加したTLY培地を使用した¹⁶⁾。表5.4は、河川水中に放置した*E. coli*を各種の測定法で測定したものである¹⁷⁾。この場合乳糖の代わりにブドウ糖が使用されているが、他の選択培地では検出できない*E. coli*が、トリプチケース・ソイを基本とした培地では生育し検出できることがわかる。そこで本研究でも、トリプチケース・ソイ (BBL社製) を基本としたTLY培地を使用する。そして、これを寒天培地としたもの、および、これに界面活性剤であるデオキシコール酸Naを0.1%添加した寒天培地の2つの培地で*E. coli*を測定することにした。添加するデオキシコール酸Naの濃度は重要な意味をもつが、これは第4節で整理する。

TLY培地には増殖を阻害する物質は含まれておらず、ストレスを受けた菌も回復して増殖する可能性がある。一方、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地で集落を形成する菌は、界面活性剤存在下でも増殖可能、すなわちストレスをあまり受けていない菌ということになる。このTLY寒天培地法とBGLB-MPN法との対応関係については第4節で整理する。

3.2 砂ろ過水中での*E. coli*の塩素処理実験

TLY液体培地で培養し菌数濃度が約 2×10^8 N/ml に達している *E. coli* 液を、琵琶湖南湖表流水の砂ろ過水で3回遠心分離洗浄した。ついでこの菌液をさらに砂ろ過水で希釈し、*E. coli* 数が 7.0×10^5 N/ml となるようにした。つぎに塩素を添加し、任意の接触時間が経過した後、砂ろ過水を取りだして、亜硫酸ナトリウムで脱塩素した。図5.2のように、100mg/lまでの亜硫酸ナトリウムが*E. coli*に影響を及ぼさないことも確認している。砂ろ過水中の*E. coli*を、TLY寒天培地および0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地で測定した。結果を図5.3に示す。

塩素添加によって、TLY寒天培地、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地の測定値は共に減少するが、その後、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地の測定値のみが増大する現象が幾度か認められた。塩素注入量0.1mg-Cl/lの場合をみると、接触時間10分においては、全体の菌数に対する0.1%デオキシコール酸Na含有寒天培地の測定値の割合は0.97%であったものが、接触時間30分においては、その割合は7.2%に増大している。これは、接触時間10分時には0.1%デオキシコール酸Na共存下では増殖できなかった*E. coli* (●と○との差で表される)のうち、接触時間

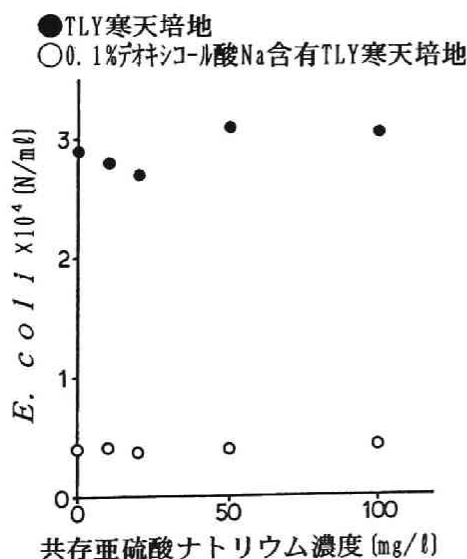


図5.2 亜硫酸ナトリウムの影響

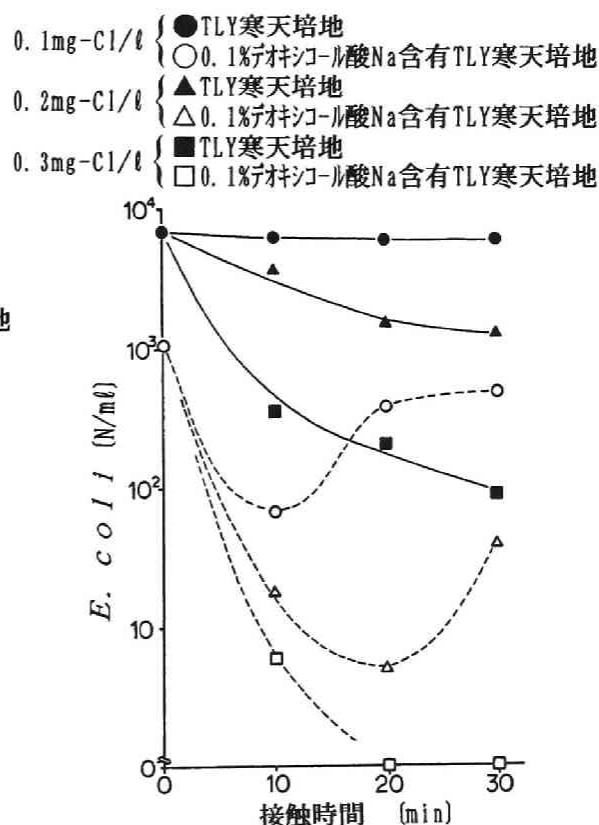


図5.3 *E. coli*の塩素処理

30分時には増殖できる*E. coli*に変わったものがあることを示している。すなわち、接触時間中、塩素が消費されたのにも関わらず、塩素によって一旦ダメージを受けた*E. coli*のうち、一部が砂ろ過水中で回復し、生菌となるものが現れる可能性を示唆している。

3. 3 種々の水中での回復と再増殖

(1) 砂ろ過水

図5.3で観察された回復を、さらに確認するため、図5.1と同様な実験を再度行った。すなわち、TLY液体培地で培養し、菌体濃度が約 2×10^8 N/ml に達している*E. coli*液を、琵琶湖南湖表流水の砂ろ過水で3回遠心分離洗浄した。ついで、この菌液をさらに砂ろ過水で希釈し、*E. coli*数が 6.3×10^5 N/ml となるようにした。つぎに、塩素を0.1mg-Cl/lとなるように添加し、10分間接触させた後、亜硫酸ナトリウムで脱塩素した。新たに準備した滅菌済み砂ろ過水 (pH7.4, 濁度0.0, E_{260} 0.0096) 250ml中に塩素処理菌20mlを投入し、30℃で静置しつつ、経時的にTLY寒天培地および0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地で*E. coli*数を測定した。結果を図5.4に示す。

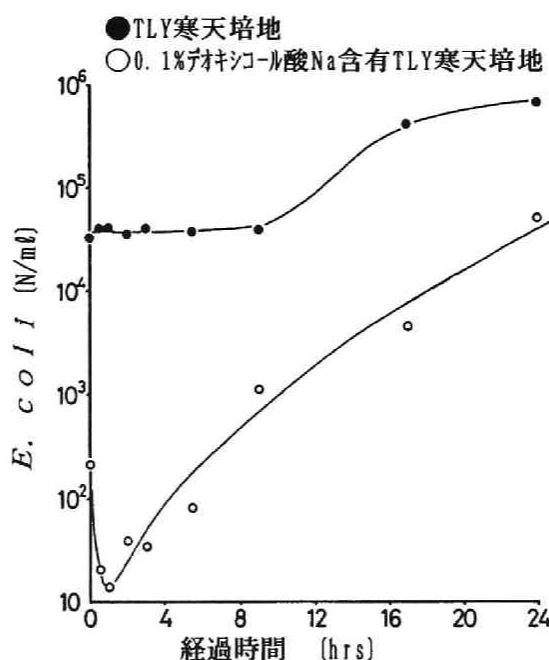


図5.4 塩素処理菌の砂ろ水中での回復 (TLY寒天培地による測定)

塩素処理により、一部の*E. coli*は死滅し一部の*E. coli*は生残した。塩素処理をしない場合、図5.4の初期における全体の菌数は計算上 4.42×10^4 N/ml となるが、これに対し図5.4では 3.4×10^4 N/ml となっている。すなわち塩素処理によって27.6%が死滅したことになる。また、図5.4の経過時間0における菌数をみると、生残菌のうち、99.3%が0.1%デオキシコール酸Na含有TLY培地では生育できない*E. coli*となっていることがわかる。はじめの1時間までは、全体の菌数が変化していないにもかかわらず、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地の測定値が減少している。これは塩素との接触は10分間で終了したものの、この影響が残存してダメージ菌の割合が増大したものと思われる。全体の菌数に変化はないので、このダメージは非致死的なものであると推察できる。さてその後は、時間とともに0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地の測定値の割合が増大していることから、やはり塩素によって一旦ダメージを受けた*E. coli*のうち、砂ろ過水中で回復する一部の*E. coli*があることが推察できる。また、TLY寒天培地の測定値が増大していることから、砂ろ過水中で増殖がおきていることがわかる。この結果は、残留塩素がなくなれば、給水過程で実際に回復と再増殖がおきうることを示している。

(2) 高濃度SS共存下

給水過程で、濁質濃度の高い環境があれば、そこでの回復と再増殖はより速やかにおきうるのではないかと考え、つぎの実験を行った。

まず、琵琶湖水を導水し着水させている100ℓ容タンクの壁面に付着した泥を採取し、SS分を高濃度に含む琵琶湖水を作製した。(1)と同様の操作で処理した塩素処理菌液20mlを、上記のSS分を高濃度に含む琵琶湖水（滅菌済み、pH7.0）250ml中へ投入し、30℃で静置しつつ、経時的に*E. coli*数を測定した。結果を図5.5(1)、(2)に示す。

図5.4の砂ろ過水中と比較して、回復と再増殖が速やかにおきていることがわかる。図5.5(1)、(2)はそれぞれ塩素処理菌液を投入した後の最終SS濃度が380mg/ℓの場合と1530mg/ℓの場合とを示しているが、両者を比較するとSS濃度の高い後者の方が回復と再増殖がやや速やかにおきた。以上の結果は、給水過程で、濁質濃度の高い環境があれば、そこでの回復と再増殖はより速やかにおきうることを示唆している。

一般に、配水系統における各種の表面、すなわち濁質、生物膜、藻類、無脊椎動物、活性炭微粒子などの表面は消毒剤の作用から逃れて微生物の良い住みかとなり

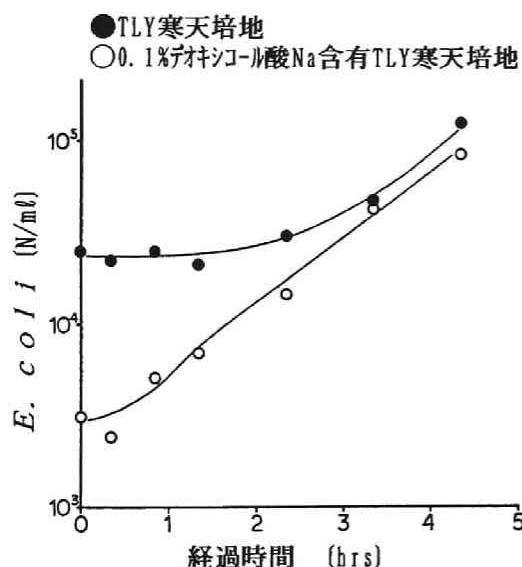


図5.5 (1) 塩素処理菌の高濃度SS中での回復 (SS濃度380mg/l)

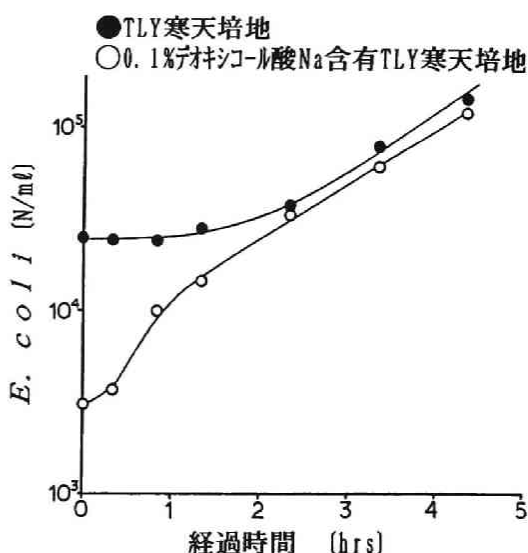


図5.5 (2) 塩素処理菌の高濃度SS中での回復 (SS濃度1530mg/l)

うる場合があるという^{18) 19)}。それらの中には、微生物の検出率が高かったり微生物が集落を形成している場合があり、これら微生物を不活化するには通常より強い消毒力を必要とする^{18) 20)}。これら表面は、微生物を消毒剤から守る働きをするとともに微生物の生育に必要な栄養分をも提供しうる。実際、飲料水中の非致死のダメージ菌の割合は全体の95%以上であることが多い²¹⁾のに、生物膜中の非致死のダメージ菌の割合を調べたところ20%にすぎなかったという²²⁾。このように沈殿物や生物膜は、本実験で扱っているような回復と再増殖とが実際におきやすい場であると考えられる。

また硫酸アルミニウムによるフロック泥を高濃度に含む琵琶湖水中でも同様な実験を行った。連続的に琵琶湖水を導水し15mg/lの硫酸アルミニウムを注入して凝集沈殿処理を行っている装置に堆積したフロック泥を採取し、SS濃度として上の実験と同程度に含む琵琶湖水を作製した。この中に(1)と同様の操作で処理した塩素処理菌を投入した。結果を図5.6に示すが、図5.5(1), (2)とほぼ同様に速やかな回復と再増殖が観察された。

(3) 高度処理水中

つぎに、砂ろ過水をオゾン処理または活性炭処理した水中で回復と再増殖がおきるかについて検討した。オゾン処理水は、 $E_{260}0.021$ の砂ろ過水を、接触時間30分、オゾン注入率9.1mg- O_3 /lで処理し、 $E_{260}0.0063$ となったもの、また活性炭処理

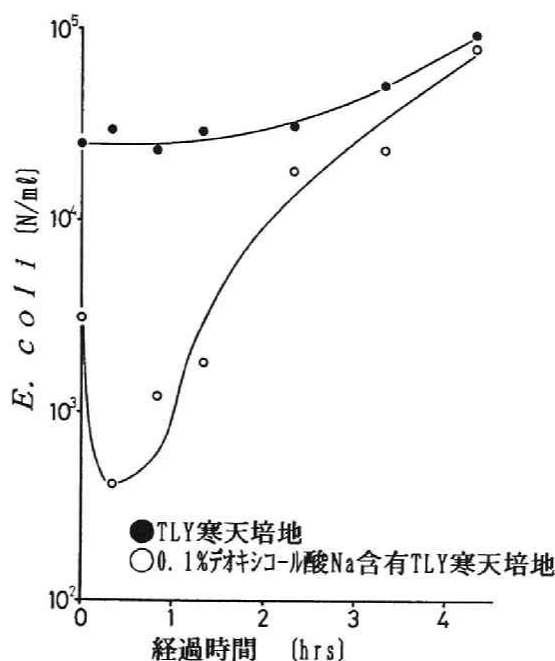


図5.6 塩素処理菌のフロック泥中での回復
(フロック泥濃度1840mg/l)

水は、同じ砂ろ過水を、滞留時間30分で活性炭ろ過し、 E_{260} 0.0004となったものを用いた。(1)と同様に処理した塩素処理菌を、オゾン処理水または活性炭処理水中に投入し、30℃で静置しつつ、経時的に*E. coli*数を測定した。結果を図5.7、図5.8に示す。初期に0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地の測定値が減少するのは、やはり塩素による非致命的ダメージが継続しているものと推察される。しかし、その後0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地の測定値の割合は増大することから、一旦塩素によってダメージを受けた*E. coli*が回復していることがうかがえる。また実験時間内での量は小さいものの、再増殖もおきている。このように、オゾン処理水、活性炭処理水といった高度処理水中でも、回復と再増殖はやはりおきうることがわかった。

3. 4 塩素ダメージ菌に対する残留塩素の影響

ここでは一旦塩素によるダメージを受けた菌が、少量の残留塩素が存在する砂ろ過水中でいかなる挙動を示すかを調べた。

まず実験時間中の塩素消費を極力なくすため、砂ろ過水に、3日毎に2回 1mg-

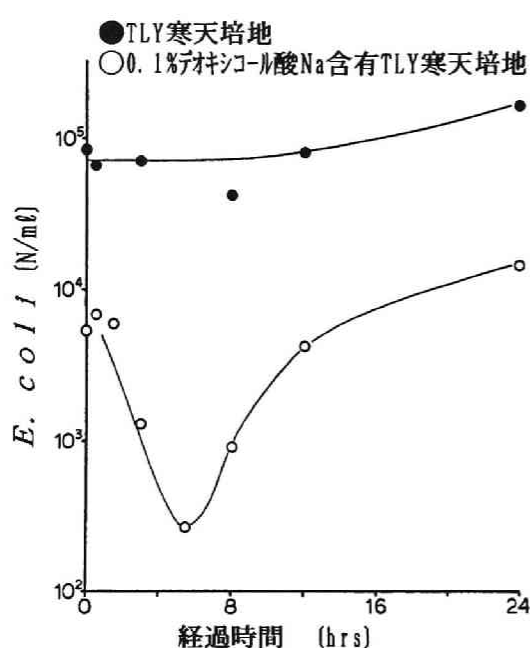


図5.7 塩素処理菌のオゾン処理水中での回復

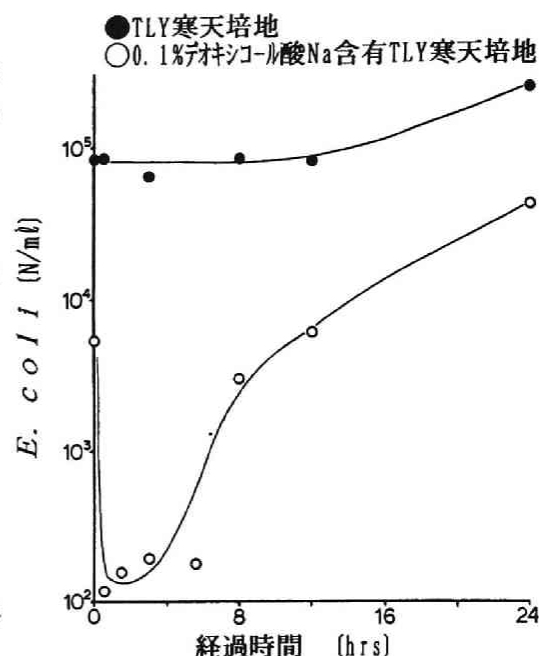


図5.8 塩素処理菌の活性炭処理水中での回復

Cl/lの塩素を注入して放置し、砂ろ過水の塩素要求量をほぼゼロにした。その後この砂ろ過水に対して、改めて残留塩素が所定の値となるように塩素を添加した。この砂ろ過水250ml中へ3.3 (1)と同様に塩素処理した*E. coli*菌液20mlを投入した。経時的に*E. coli*数を測定した結果を図5.9に示す。なお、接触時間中、残留塩素はほぼ所定の値に保たれていた。図より、砂ろ過水中では、残留塩素が低濃度でも存在すれば回復と再増殖はおこらず死滅に向かうことがわかる。このことから消毒剤の残留性の重要性が確認できるが、他の消毒剤の検討も含めて、第6章でさらに検討する。

第4節 BGLB-MPN法とTLY寒天法との対応

ここではTLY寒天法が、BGLB-MPN法のどの部分を測定しているかについて整理する。

TLY液体培地中で対数増殖期にある*E. coli*を蒸留水で3回遠心分離洗浄し、さらに蒸留水で500倍に希釈して1時間放置する。この間に一部の*E. coli*はBGLB培地中での増殖能を失う。蒸留水で段階希釈した後、BGLB培地によってMPNを測定 (10本法

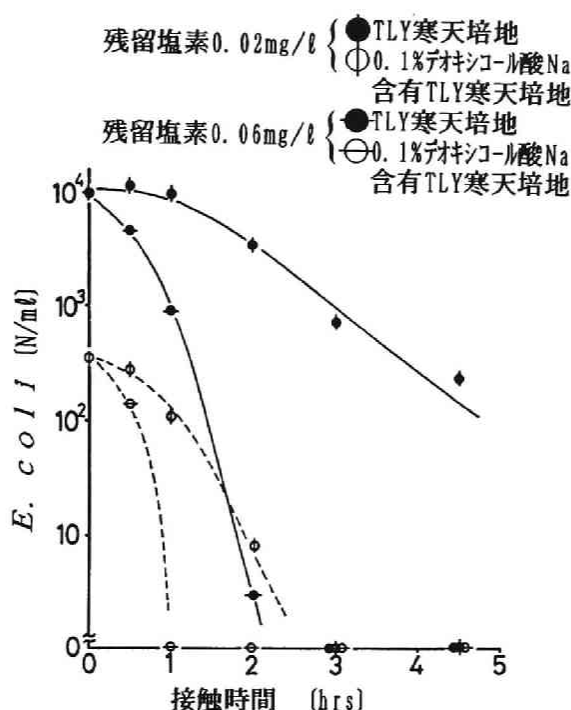


図5.9 塩素処理菌に対する残留塩素の影響

すると図5.10のAのレベルになった。一方、BGLB培地を使わずTLV液体培地によってMPNを測定するとBのレベルになった。このように*E. coli*は実際にはBのレベル存在するのであるが、BGLB培地中ではその選択性ゆえに増殖できない菌が存在することがわかる。そしてこれらの菌はTLV液体培地中では回復し、増殖することを示している。さて、折れ線Cは、同じ試料をまずTLV液体培地で1時間、2時間、3時間の各時間前培養した後、2倍濃度のBGLB培地を等量加えて36℃、48時間培養し、MPN測定したものである。TLV液体培地で前培養すると、選択性のBGLB培地中でも増殖が可能となる*E. coli*が現れることがわかる。さらに回復時間を2時間とすればTLV液体培地のみの測定値に近づくこともわかる。

一例として、琵琶湖水中大腸菌群を、TLV液体培地で前培養（回復操作）する方法を加えて測定してみた。測定方法を示す。①試水を0.1%ペプトン含有67mMリン酸緩衝液で段階希釈（希釈水組成の影響については図5.14参照）。②一方は通常法どおりBGLB培地中に添加し、36℃、48時間培養する。③もう一方はTLV液体培地4.5mlに試水1mlを添加する。以下③のサンプルに対し、④36℃、2時間培養。⑤2倍濃度のBGLB培地4.5mlを添加。⑥36℃、48時間培養。1990年10月～11月に35回測定した結果を図5.11に示す。BGLBによるMPNの平均値が 3.94×10^2 N/100ml であるのに

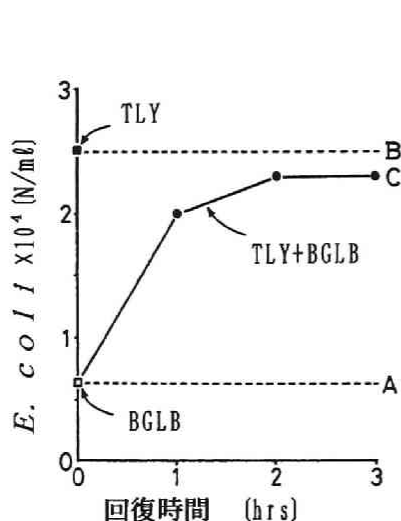


図5.10 *E. coli*のBGLB-MPN測定

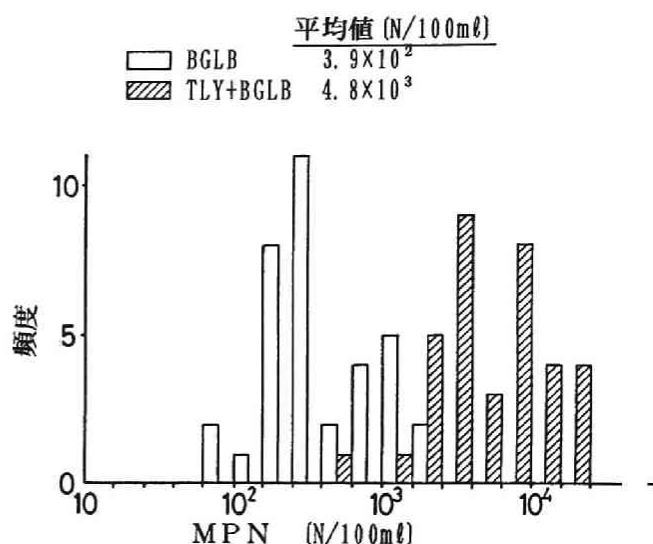


図5.11 琵琶湖南湖表流水中大腸菌群測定結果 (1990年10月~11月, 測定回数35回)

対し、TLY+BGLBによるMPNの平均値は 4.82×10^3 N/100ml であった。琵琶湖水中には、BGLB培地で測定される大腸菌群の10倍以上の大腸菌群が存在していることがわかる。すなわち、大部分の大腸菌群はそのままではBGLB培地中で増殖することはできず、TLY培地での前培養中に、選択培地であるBGLB培地中での増殖能を獲得するものと考えられる。

つぎに、TLY液体培地中で対数増殖期にある *E. coli*を、蒸留水で3回遠心分離洗浄し、さらに蒸留水で500倍に希釈して1時間放置した後、*E. coli*数をTLY寒天法 (TLY寒天培地および0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地) およびBGLB-MPN法 (TLY液体培地+BGLB培地およびBGLB培地) で測定した。両測定法ともに、培養温度は36℃、培養時間は48時間である。測定値を表5.5に、測定値間の大小関係を図示したものを図5.12に示す。図5.12では、TLY寒天培地による測定値を1として表示した。

まず、TLY寒天培地による測定値とTLY液体培地+BGLB培地によるMPN値とはほぼ一致することがわかった。これより、TLY寒天培地での測定値に相当する大腸菌群は、TLY液体培地で2時間前培養した後、2倍濃度のBGLB培地を等量加えるMPN法でも測定できることがわかる。

また、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地での測定値は、BGLB培地によるMPN値よりはるかに小さく、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地では、ストレスの極めて少ない *E. coli*を測定していると推察される。そこで、非ストレス菌のデ

表5.5 TLY寒天培地法とBGLB培地-MPN法による*E. coli*の測定

TLY寒天培地法		BGLB培地-MPN法	
TLY	3.6×10^5	TLY+ BGLB	3.2×10^5
TLY+ 0.1%D	8.3×10^2	BGLB	6.8×10^4

値の単位はN/ml, Dはデオキシコール酸Naを表す

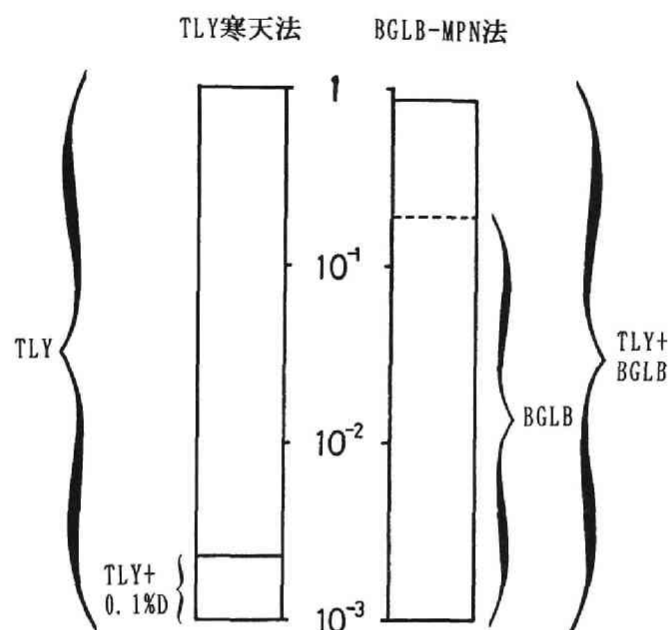


図5.12 TLY寒天培地法とBGLB培地-MPN法との対応
TLY寒天培地でえられた測定値を1として表示
Dはデオキシコール酸Naを表す

デオキシコール酸Naに対する感受性を調べるため、つぎの実験を行った。TLY液体培地中で対数増殖期にある*E. coli*を、TLY液体培地で1000倍に希釈した後、所定濃度のデオキシコール酸Naを含むTLY寒天培地で培養し、形成した集落を計数した。結果を図5.13に示す。図から、対数増殖期にあり、ストレスがないと想定される*E. coli*は、0.1%までのデオキシコール酸Naの影響をほとんど受けないことがわかる。重要な点は、ストレスのない*E. coli*集団であれば、TLY寒天培地による測定値と0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地での測定値がほぼ一致することである。

以上のことから、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地で生育し測定された*E. coli*を、受けたストレスが小さいという意味で、生菌と想定することもできる。一方、TLY寒天培地でしか生育できない*E. coli*は、すでに示したように適当な環境

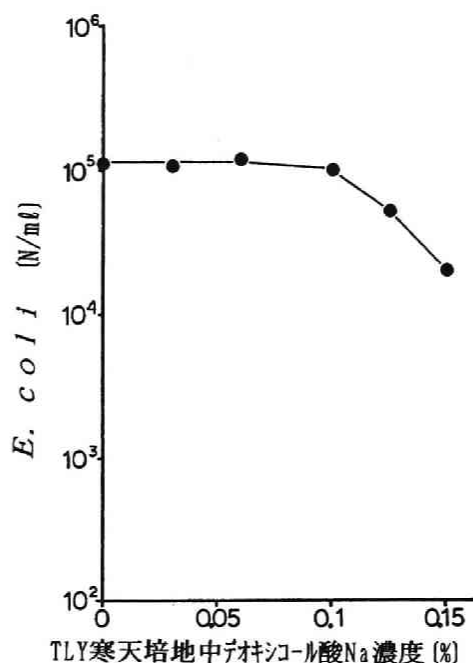


図5.13 非ストレス*E. coli*のデオキシコール酸Naに対する感受性

に恵まれれば回復し、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地で生育できるようになる菌であることから、回復可能な菌と想定することができる。逆にBGLB培地は、選択培地であるもののその選択性は低く、ここでいう回復可能な菌の多くを測定しているといえる。なお、0.1%のデオキシコール酸Naは、やはり大腸菌群測定用の寒天培地であるデオキシコール酸塩寒天培地にも含まれている。

第5節 回復可能菌を含めた消毒

ここでは消毒を生菌のみならず回復可能菌を含めて考え、各消毒処理による回復可能菌の現れ方、回復可能菌を含めて消毒処理する場合に必要な消毒力などについて検討した。なお、ここでの実験では、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地での測定値を生菌、TLY寒天培地での測定値と、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地での測定値との差を回復可能菌と想定することにする。

まずTLY液体培地中で対数増殖期にある*E. coli*を、pH7.0、67mMリン酸緩衝液で3回遠心分離洗浄した。図5.14に示すように、洗浄または希釈にリン酸緩衝液を用いれば、操作中に*E. coli*がストレスを受けないようにすることができる。洗浄済み*E.*

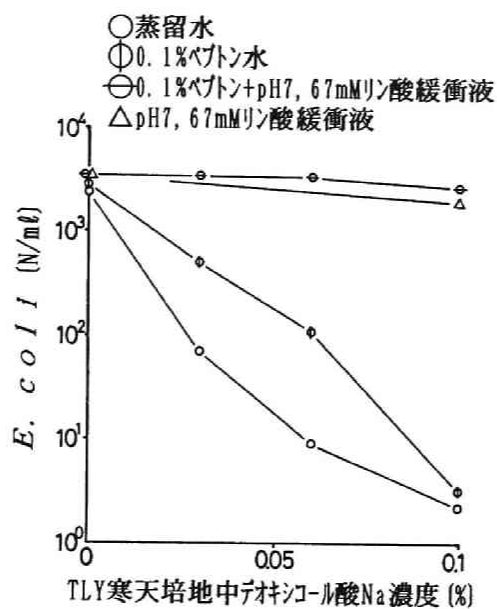


図5.14 希釈水組成の影響

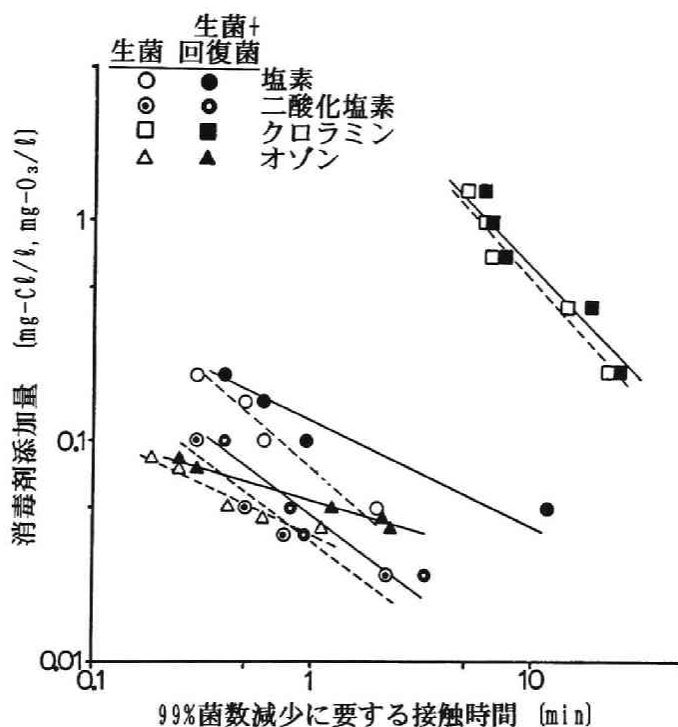


図5.15 各消毒剤による*E. coli*の処理

*coli*を、約 1×10^5 N/ml となるようにpH7.0, 67mMリン酸緩衝液に入れ、つぎに各消毒剤（すべて水溶液）を添加した。各消毒剤の調製方法および消毒剤濃度の測定方法は第4章表4.6と同じである。不活化は室温で静置して行われた。任意の接触

時間が経過した後、亜硫酸ナトリウムを添加して不活化を停止し、TLY寒天培地および0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地で*E. coli*を測定した。

横軸に99%の菌数減少に要する接触時間、縦軸に注入濃度をとって実験結果をまとめたものが図5.15である。破線は消毒処理を行うときに生菌だけを測定対象とした場合を示し、実線は生菌に加えて回復可能菌をも測定対象すなわち消毒処理の対象とした場合を示している。破線（生菌）に対して実線（生菌+回復可能菌）が上方にあることは、回復可能菌を含めて消毒処理を行うためには、注入濃度の増大または接触時間の増大が必要であることを示している。この傾向は特に消毒剤添加量の少ない範囲で現れている。これは低濃度添加の場合、非致死的なダメージしか*E. coli*に与えられず、回復可能菌割合を増大させたものと推察できる。なんらかの理由で消毒が不完全になった場合、生菌数は少ないが回復可能菌は多く存在する処理水ができることになる。そしてこの傾向は塩素とオゾンで現れやすい、といいうる。しかし、実際処理に近い、より高濃度の範囲では実線と破線の差は小さくなっている。そのような範囲では生菌数の減少に伴って回復可能菌数も減少、すなわち死滅することを示している。したがって、実際処理の範囲で回復可能菌のみが残存することは考えにくい。

第6節 結 語

1) 一旦塩素によってダメージを受けた*E. coli*が、砂ろ過水中で回復、再増殖することを示した。それは大腸菌群検査法の1つであるBGLB培地を用いたMPN法、および簡便な寒天培地法で観察された。このことから、給水過程で残留塩素がなくなれば、実際に回復と再増殖がおきうることを指摘した。

2) 水中のSS濃度が高まると回復と再増殖はより速やかにおこること、オゾン処理水、活性炭処理水といった高度処理水中でも回復と再増殖はおきうることを示した。

3) 消毒を生菌のみならず回復可能菌を含めて考え、各消毒処理による回復可能菌の現れ方、回復可能菌を含めて消毒処理する場合に必要な消毒力などについて検討した。その結果、消毒が不完全な場合には回復可能な菌の割合が増大する可能性があるものの、実際処理の範囲では回復可能菌のみが残存することは考えにくいこと

を示した。

参考文献

- 1) Andrew, M. H. E. and Russel, A. D., eds., The Revival of Injured Microbes, 394 pp., London, Academic Press, 1984
- 2) McFeters, G. A., Kippin, J. S., and LeChevallier, M. W., Injured Coliforms in Drinking Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 51, No. 1, pp. 1-5, 1986
- 3) 春田三佐夫他編, 最新食品微生物制御システムデータ集, サイエンスフォーラム, 1983
- 4) Venkobachar, C., Iyengar, L., and Prabhakara Rao, A. V. S., Mechanism of Disinfection: Effect of Chlorine on Cell Membrane Functions, Water Research, Vol. 11, pp. 727-729, 1977
- 5) Zaske, S. K., Dockins, W. S., and McFeters, G. A., Cell Membrane Damage in *Escherichia coli* Caused by Short-Term Stress in Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 40, No. 2, pp. 386-390, 1980
- 6) Venkobachar, C., Iyengar, L., and Prabhakara Rao, A. V. S., Mechanism of Disinfection, Water Research, Vol. 9, pp. 119-124, 1975
- 7) Mcfeters, G. A., Stuart, D. G., Survival of Coliform Bacteria in Natural Waters: Field and Laboratory Studies with Membrane-Filter Chambers, Applied Microbiology, Vol. 24, No. 5, pp. 805-811, 1972
- 8) Ball, W. J., Atkinson, D. E., Adenylate Energy Charge in *Saccharomyces cerevisiae* During Starvation, Journal of Bacteriology, Vol. 121, N. 3, pp. 975-982, 1975
- 9) Chapman, A. G., Fall, L., and Atkinson, D. E., Adenylate Energy Charge in *Escherichia coli* During Growth and Starvation, Journal of Bacteriology, Vol. 108, No. 3, pp. 1072-1086, 1971
- 10) Gomez, R. F., Sinskey, A. J., Deoxyribonucleic Acid Breaks in Heated *Salmonella typhimurium* LT-2 After Exposure to Nutritionally Complex Media,

- Journal of Bacteriology, Vol. 115, No. 2, pp. 522-528, 1973
- 11) Ashwood-Smith, M. J., Grant, E., Mutation Induction in Bacteria by Freeze-Drying, Cryobiology, Vol. 13, pp. 206-213, 1976
 - 12) 山口和夫, 現代応用微生物学の基礎, 技報堂出版, 1983
 - 13) 柳田友道, 微生物科学 2 成長・増殖・増殖阻害, 学会出版センター, 1981
 - 14) 微生物生態研究会編, 微生物の生態 3 増殖をめぐって, 学会出版センター, 1978
 - 15) 日本微生物協会編, 微生物学辞典, 1405pp., 技報堂出版, 東京, 1989
 - 16) McFeters, G. A., Cameron, S. C., and LeChevallier, M. W., Influence of Diluents, Media, and Membrane Filters on Detection of Injured Waterborn Coliform Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 43, No. 1, pp. 97-103, 1982
 - 17) Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., McFeters, G. A., and Stuart, D. G., Evaluation of Recovery Methods to Detect Coliforms in Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 33, No. 3, pp. 590-509, 1977
 - 18) LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D., and Lee, R. G., Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, No. 3, pp. 649-654, 1988
 - 19) Characklis, W. G., 飲料水配水施設内の生物膜, McFeters, G. A. 編, 金子光美監訳, 飲料水の微生物学, 第12章, pp. 239-256, 技報堂出版, 1992
 - 20) LeChevallier, M. W., Disinfection of Bacterial Biofilms, Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects (Jolly, R. L., et al, editors), Lewis Publishers, Vol. 6, pp. 905-915, 1990
 - 21) McFeters, G. A., LeChevallier, M. W., Singh, A., and Kippin, J. S. 著, 茂野誠一訳, 飲料水中の損傷細菌の出現と健康上の重要性, Grabow, W. O. K. 編, 水中微生物とその健康影響, pp. 210-214, 水中微生物研究会, 1989
 - 22) LeChevallier, M. W., Babcock, T. M., and Lee, R. G., Examination and Characterization of Distribution System Biofilms, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53, No. 12, pp. 2714-2724, 1987

第6章 消毒処理水の安全性に関する 考察

本章では、実験結果を総合し、消毒処理水の安全性に関して考察を行う。まず第1節では、消毒剤の重要な特性の1つである残留性に注目し実験的検討を行う。第2節では、本研究で得られた実験結果を総括し、消毒処理水の相対的安全性について考察する。さらに第3節では、モデルを用いた検討によって考察結果を補足する。第4節では、本研究で得られた結果を総合して考察を行う。

第1節 消毒剤の残留性に関する実験

第4章大腸菌ファージの不活化に関する実験では、各消毒剤の不活化力を比較した。しかし、消毒処理水の微生物的安全性を評価するためには、消毒剤の不活化力とともに、消毒剤そのものの残留性という側面を欠かすことはできない。例えば、不活化力が強くても残留性がないならば上水に単一の消毒剤として使用することは不可能であるし、逆に残留性に優れたものであってもその不活化力が弱いならばやはり消毒剤としては不適当である。そこで本節では、消毒剤の残留特性を把握するため、1, 2の簡単な実験を行った。また本研究では、琵琶湖水を対象としているので、琵琶湖水中有機物が存在する条件下での残留性を調べる。

1. 1 実験方法

まず、第3章第2節 実験方法 に示したのと同じ手順で濃縮琵琶湖水を作製した。すなわち、琵琶湖水をXAD-2樹脂に通水した後、吸着成分をジエチルエーテルで抽出し、蒸発乾固させた残渣を蒸留水に再溶解した。このとき、 $\text{pH}7.10$ 、過マンガン酸カリウム消費量 1570mg/l 、 $E_{260}=9.0$ であった。この濃縮琵琶湖水を、有機物濃度が琵琶湖水中とほぼ同じになるように、 $\text{pH}7.0$ 、 67mM リン酸緩衝液で $1/450$ に希釈した。このとき、過マンガン酸カリウム消費量 3.5mg/l 、また、 $E_{260}=0.02$ となった。この濃縮湖水は、上記の第3章第2節と同じ方法で作製したものであるので、アン

モニア性窒素など有機物以外の消毒剤消費物質は含まれていないと考えることができる。

1 ℓ容の細口共栓試薬瓶に濃縮湖水の希釈水を1 ℓ入れた。ついで各消毒剤を添加したが、消毒剤は、第4章第2節 表4.6 消毒剤の調製方法と濃度測定方法 に示した方法にしたがって作製した。したがって、各消毒剤はすべて水溶液として10mlを添加した。ただちに栓をして室温、暗所に静置し、残留濃度の経時変化を測定した。なお、消毒剤濃度の測定方法も同じく第4章第2節表4.6に示した方法にしたがった。

1. 2 実験結果と考察

塩素、オゾン、二酸化塩素、クロラミンの消費実験例をそれぞれ図6.1, 図6.2, 図6.3, 図6.4に示す。図中の実線は、第3節で行うモデルによる計算結果を示している。モデルを用いた検討は、第3節に譲ることとし、ここでは実験の定性的結果を述べる。

まず、塩素（図6.1）は、注入初期に急激な減少があり、その後減少は緩やかになっている。一般に自然水中の有機物には、急速に塩素を消費する成分と比較的ゆっくり消費する成分があることが知られるが、本研究で使用した濃縮琵琶湖水中の有機物でも同じことがいえる。初期の急速消費の後の、緩速消費の領域が、塩素の残留性を意味する。

オゾン（図6.2）は、まず、有機物のない蒸留水中でも自己分解によって消費す

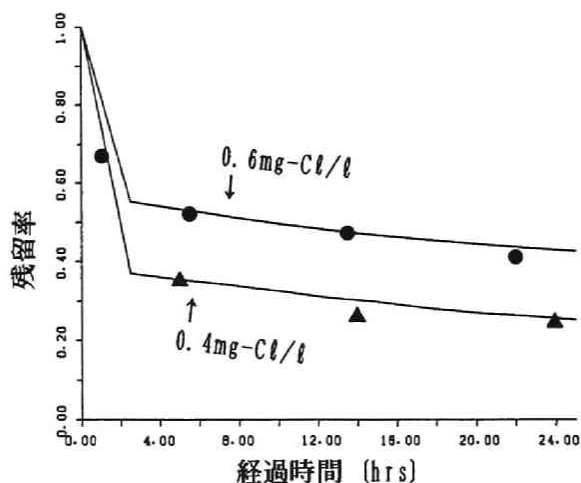


図6.1 塩素消費の例

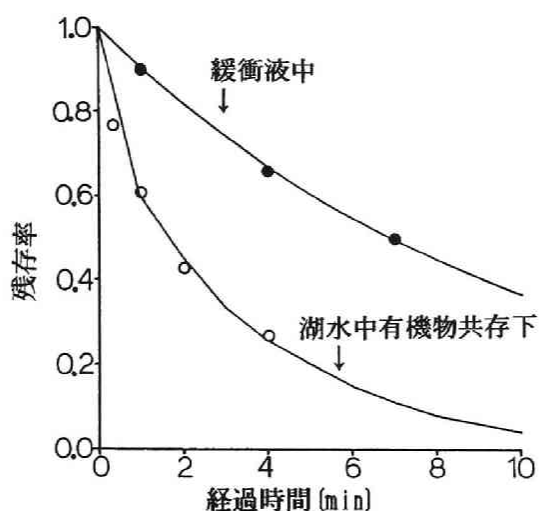


図6.2 オゾン消費の例
(オゾン注入量 $0.95\text{mg-O}_3/\ell$)

る。図6.2の上側の曲線は、 $\text{pH}7.0$ 、 67mM リン酸緩衝液中でのオゾン消費を表す。一次反応を仮定すると速度定数 0.094 (l/min) を得た。室温、中性の蒸留水中におけるオゾンの半減期は約10分であるとされる¹⁾が、本実験では7分とやや消費速度が大きい。本実験では、リン酸緩衝液やガラスビンのオゾン要求量をゼロにしていいため、不純物質がオゾン消費する効果があったものと思われる。一方、琵琶湖水中有機物が共存する場合には、オゾンはこれよりも速やかに消費する。図6.2の例（オゾン注入量 $0.95\text{mg-O}_3/\ell$ ）では、数10分で消失するであろうと推察され、オゾンの残留性は飲料水の供給に要する時間からみて全く不十分であるといえる。

二酸化塩素（図6.3）は、塩素と同様、注入初期に急激に消費し、その後緩やか

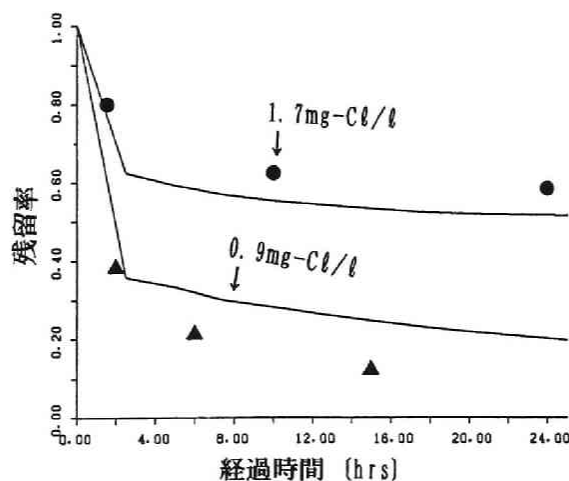


図6.3 二酸化塩素消費の例

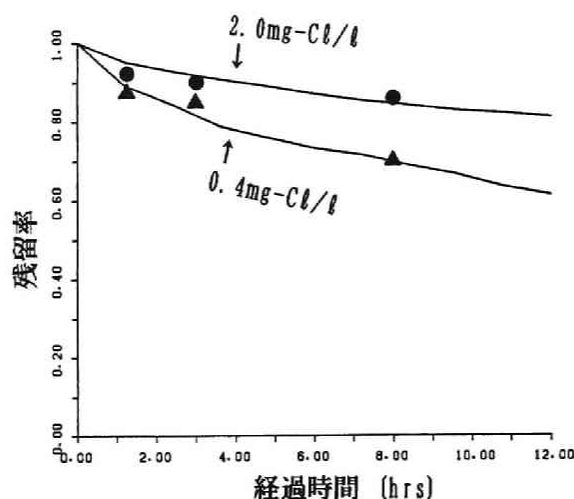


図6.4 クロラミン消費の例

な消費速度となる傾向がみられる。ただし、二酸化塩素注入量 0.9mg-Cl/l の場合をみると、塩素を 0.4mg-Cl/l 、 0.6mg-Cl/l 注入した場合（図6.1）よりも速やかに消費しており、塩素と比較して二酸化塩素の残留性は低いと推察しうる。

クロラミン（図6.4）は、初期の急激な減少も明確にはみられず、注入直後から緩やかに減少した。微生物の不活化力が弱いとともに有機物との反応性も低いと思われる。注入量 0.4mg-Cl/l の場合の残留性を塩素（図6.1）と比較すると、クロラミンの方が残留濃度が高い。有機物との反応性も低いこととあわせると、塩素以上の残留性が期待できる。

芦立²⁾は、汚濁小河川水、および清浄河川水に下水処理場の流入下水を少量添加したものを試水とし、これに塩素と二酸化塩素を添加してその残留濃度の変化を調べた。ただし試水は三角フラスコに入れられ、実験は開放系で行われた。塩素、二酸化塩素の添加濃度はそれぞれ 3mg/l である。結果を図6.5、図6.6に示す。図より、塩素よりも二酸化塩素の方が速やかに消失しており、本実験結果と同じ結果となっている。しかし、図6.5、図6.6の実験は開放系で行われており、揮発性の高い二酸化塩素が揮散した影響が考えられるため、被圧下の給配水系統での残留性については今後検討する必要があるとしている。二酸化塩素の残留性を調べた図6.2の本実験においては、 1l 容細口共栓試薬瓶を用い、静置中は栓をしているものの、完全に気層をなくしての実験ではない。したがって芦立の実験と同様に、二酸化塩素の揮散の影響が含まれていると思われる。文献的にも、二酸化塩素水溶液は、気層をなくし冷暗所におけば数ヶ月保存が可能であるものの、気層があると二酸化塩素は

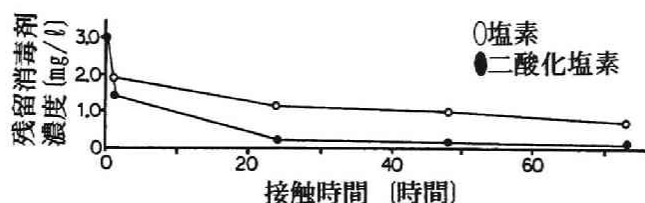


図6.5 塩素と二酸化塩素の残留性²⁾
(試料：汚濁小河川)

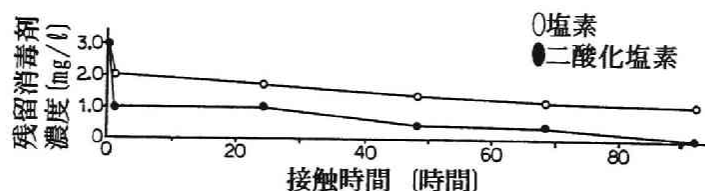


図6.6 塩素と二酸化塩素の残留性²⁾
(試料：下水・河川混合水)

気層に移行しやすく不安定になるという³⁾。したがって二酸化塩素の残留性を厳密に評価しようとするれば、浄水場内のような気層のある場、給水系統のような気層のない場など、二酸化塩素処理水の存在する場を想定した検討が必要である。このことは他の消毒剤についてもあてはまる。

一方、佐藤⁴⁾は、朝霞浄水場原水を試水として、遊離塩素とクロラミンの残留性を比較した。遊離塩素とクロラミンの添加濃度は1mg/l程度であり、各処理水を別々の褐色瓶(500ml)に封入後、所定の温度に保存し、残留濃度を測定したものである。保存温度20℃の場合の、遊離塩素、クロラミンの濃度変化をそれぞれ図6.7、図6.8に示す。同様に保存温度30℃の場合の、遊離塩素、クロラミンの濃度変化をそれぞれ図6.9、図6.10に示す。図から、遊離塩素処理水は、特に8月の場合、4月および10月に比べて特に大きな減少傾向を示し、20℃で7日後、30℃で5日後には残留塩素が消失した。一方、クロラミン処理水は、各実験時ともに水質の違いにかかわらず同様の減少傾向を示し、実験終了時までクロラミンは残留した。この結果、佐藤は、塩素よりもクロラミンの方が、水温の変化や水中の有機物質の多少にかかわらず、残留消毒剤の持続日数が長く、年間を通じて安定していると述べている。塩素よりもクロラミンの方が、残留性が優れているという点で、本節の実験結果と一致している。

以上、実験結果を示し、文献における結果を参照した。実験結果および文献における結果ともに、残留性の点で最も優れているのはクロラミンであり、ついで塩素

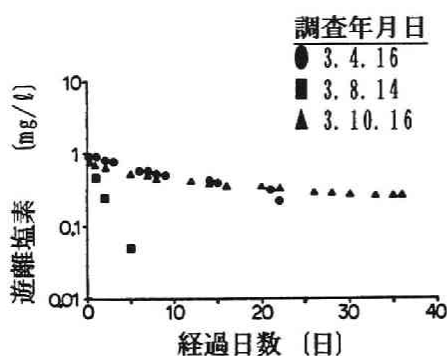


図6.7 遊離塩素の経日変化⁴⁾
(20℃)

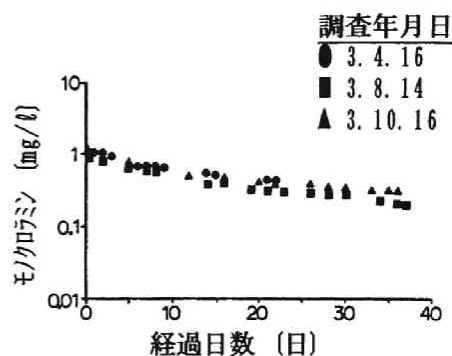


図6.8 クロロミンの経日変化⁴⁾
(20℃)

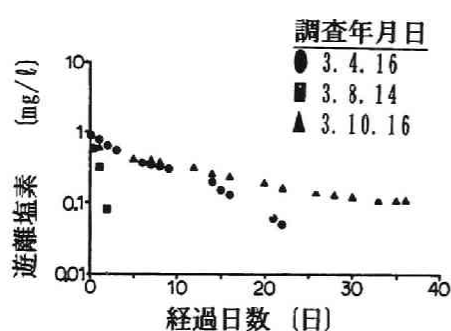


図6.9 遊離塩素の経日変化⁴⁾
(30℃)

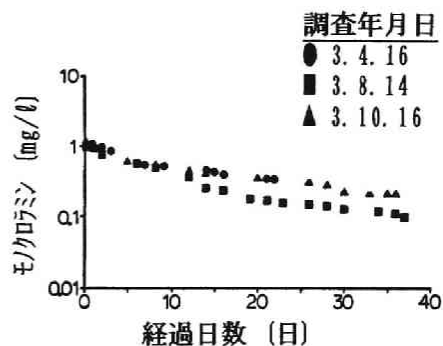


図6.10 クロロミンの経日変化⁴⁾
(30℃)

が優れていた。二酸化塩素は、気層のある実験においてはあがあるが、本実験結果および文献における結果ともに、その残留性は塩素よりは低かった。またオゾンの残留性はないといえた。

第2節 実験結果から結論される消毒処理水の相対的安全性

本節では、本研究で行った実験結果を総括し、消毒処理水の相対的安全性について考察する。実験結果を、消毒剤の優劣を比較する形式でまとめたものが表6.1であり、以下その内容を述べる。

(1) 染色体異常誘発性について

第3章 図3.31 消毒処理水の染色体異常誘発性 をまとめたものである。本実験では420倍に濃縮した琵琶湖水を用いている。したがって、実際の琵琶湖水にお

表 6. 1 実験結果のまとめ

	染色体異常誘発性	不活化力	残留性
塩素	4	2	2
二酸化塩素	3	1	3
クロラミン	1	4	1
オゾン	2	3	4

1：最も優れている、 4：最も劣っている

染色体異常誘発性：チャイニーズハムスター肺細胞 (CHL) を用いた染色体異常試験の結果。濃縮した琵琶湖水を消毒処理したものをそのまま染色体異常試験の試料とした。

不活化力：琵琶湖水中有機物が存在する水中で、大腸菌ファージに対する不活化力を比較した結果。アンモニア性窒素など有機物以外の消毒剤消費物質は含まれていない。

残留性：琵琶湖水中有機物が存在する水中での残留性。共栓細口試薬瓶中での結果であり、気層は残っている。

る消毒剤消費量と染色体異常誘発性については、図3.31の420mg/lの位置が、実際の琵琶湖水に消毒剤 1 mg/l を消費させた場合に対応するとみなすことにより、染色体異常誘発性の大小関係を比較する。実際の消毒剤注入範囲が0.5mg/l～5 mg/lの範囲であるとすれば、図3.31では、210mg/l～2100mg/lの範囲で大小比較を行えばよい。

まず塩素処理水は、低消費量範囲から染色体異常誘発性を有意に認め、4種の中では最も強い。つぎに二酸化塩素処理水は、塩素処理水よりも弱く、最大でも塩素処理水の1/2程度である。オゾン処理水は、高消費量範囲では塩素処理水以上となっているものの、通常の消毒範囲では、塩素処理水や二酸化塩素処理水よりも染色体異常誘発性は弱いと考えてよいであろう。またクロラミン処理水の染色体異常誘発性は認められない。この結果から染色体異常誘発性からみた消毒剤としては、通常の消毒の範囲では、クロラミンが最も優れており、ついでオゾン、二酸化塩素の順で、塩素が最も劣っていると結論できる。

(2) 不活化力について

表6.1の不活化力は、大腸菌ファージの不活化力を調べた図4.12のうち、琵琶湖水中有機物が共存する条件下での結果をまとめたものである。この場合、順位は明らかであり、大腸菌ファージの不活化力からみた消毒剤は、二酸化塩素が最も優れており、ついで塩素、オゾンの順で、クロラミンが最も劣っている。

(3) 残留性について

表6.1の残留性は、本章第1節の結果をまとめたものであるが、実験方法も簡単な上、データ数も限られているため、定性的な比較にとどまる。塩素は、注入初期に急激な減少があり、その後緩やかな減少となって残留する。二酸化塩素は、塩素よりもやや速やかに減少した。クロラミンは、塩素以上の残留性が期待しうるものと推察できた。また、オゾンの残留性は、飲料水の供給に要する時間からみて全く不十分であり、残留性はないといえた。この結果、残留性の点で最も優れているのはクロラミンであり、ついで塩素が優れている。二酸化塩素は、塩素よりは残留性に劣っており、オゾンが最も劣っている。

つぎに各消毒処理水ごとにその特徴を整理する。

(1) 塩素

残留性に優れ、不活化力も大きいので、飲料水の微生物的安全度に対する信頼性は高い。しかし、処理水の染色体異常誘発性が最も強い点が欠点である。

(2) 二酸化塩素

処理水の染色体異常誘発性が塩素処理水よりも弱い点で望ましい。また、残留していれば塩素よりも大きな不活化効果が発揮される。すなわち二酸化塩素は、不活化力が塩素よりも大きく、しかも処理水の染色体異常誘発性が塩素処理水よりも弱い点で、塩素よりも優れた消毒剤であると指摘しうる。しかし、残留性は塩素よりも劣り、残留濃度に注意する必要がある。

(3) クロラミン

本実験条件では処理水の染色体異常誘発性は認められず、好ましい結果を得た。また、残留性は優れていると推察されたものの、不活化力が著しく小さいのが欠点である。

(4) オゾン

処理水の染色体異常誘発性は、消毒に使用する範囲では塩素処理水や二酸化塩素処理水よりも低く抑えることができる。しかし残留性がなく、単独での使用は適切

でない。

以上実験結果をまとめたが、この結果、二酸化塩素は、不活化力が塩素よりも大きく、しかも処理水の染色体異常誘発性が塩素処理水よりも弱い点で、消毒剤としての優れた特性を備えているといえる。したがって、残留性を確保しつつ使用するならば、処理水の微生物的安全性を十分確保しつつ、副生成物による有害性が低い飲料水を供給することが可能であり、二酸化塩素は優れた消毒剤であるといえる。

第3節 不活化力と残留性との関係のモデルによる検討

3. 1 本節の目的

前節では、実験結果をまとめて、残留性が確保されるように消毒処理を行えば二酸化塩素が優れた消毒剤であることを指摘した。しかしいずれも定性的な考察にとどまっている。特に消毒処理水の微生物的安全性については、第1章第1節において、それが消毒剤の不活化力と残留性の2つの特性によって達成されることを指摘したにもかかわらず、実験結果を定性的に考察したのみである。本節では、消毒処理水の微生物的安全性に対する不活化力と残留性の役割を定量的に評価するため、消毒処理における消毒剤と有機物との反応、消毒剤と微生物との反応のモデル化を行って、考察をすすめる。

3. 2 モデルの設定

(1) モデルの基本的考え方

消毒処理過程では、有機物と消毒剤とが反応して副生成物が生成する過程と、微生物と消毒剤とが反応して微生物が死滅する過程とがある。そしていずれの反応でも消毒剤は消費する。このうち、有機物と消毒剤との反応では、塩素消費（図6.1）、二酸化塩素消費（図6.2）でみられたように、有機物のなかには消毒剤と反応しやすいものと反応しにくいものがあると推察される。したがってモデルの設定にあたっては、消毒剤粒子と有機物粒子とが衝突したとき、反応しやすい場合や反応

しにくい場合が表現できるもの、また、有機物粒子ごとに、消毒剤粒子が複数回反応することができたり、1回しか反応しないもの、あるいは全く反応しないものなどを表現できることが望ましい。さらに、消毒剤との反応においては有機物と微生物とは競合関係にある。このような反応を表現しうるものとしてつぎのようなモデルを設定した。水中の微小空間に、消毒剤、有機物、微生物（ここでは大腸菌ファージ）がランダムに運動している場を考える。ある瞬間の消毒剤－大腸菌ファージ間、消毒剤－有機物間の距離を測定し、その距離がある値以下ならば衝突が起きたものと判定し、消毒剤の消費、大腸菌ファージの不活化、副生成物の生成（ここでは染色体異常誘発性の生成）が起きるものとする。衝突が起きたとみなす距離は、各粒子の大きさを表すというよりはむしろ、消毒剤との反応の起き易さを表すものとする。そして、消毒剤と有機物との反応特性に関しては、有機物の反応性に分布があることを仮定する。このようなモデルにより、個々の有機物粒子に対して特徴付けをすることが可能となり、消毒過程における多様な反応性を表現できるものとする。

（２）モデルの基本構造

水中に 1.0×1.0 の 2 次元正方形を想定し、一様乱数を用いて、この中に大腸菌ファージ、有機物、消毒剤を一様に散らばらせる。すなわち、0 から 1 までの一様乱数を発生させて、各粒子の x 座標、 y 座標を与えた。大腸菌ファージの個数は、実験での初期大腸菌ファージ数が $1000 \sim 3000$ PFU/ml であったことから、2000 とした。有機物の個数は、 $E_{260} = 0.02$ が 4000 個に対応するように、また消毒剤の個数は、 0.1 mg/l が 1000 個に対応するようにした。

つぎに正規乱数を発生させて各粒子を移動させ、1 タイムステップ後の各粒子の位置を次式のように求める。

$$x = x_0 + dt \times D \quad (1)$$

$$y = y_0 + dt \times E \quad (2)$$

ここに、 D 、 E は平均値 0、標準偏差 1 の正規乱数、 dt は 1 タイムステップを表し、ここでは 50 分が 0.05 に対応するようにした。

各粒子の移動後、消毒剤－大腸菌ファージ間、消毒剤－有機物間の距離を測定し、その距離がある値以下ならば衝突が起きたものと判定し、消毒剤の消費、大腸菌ファージの不活化、副生成物の生成（ここでは染色体異常誘発性の生成）が起きるも

のとした。消毒剤と大腸菌ファージの反応に関しては、衝突が1回でも起これば、消毒剤は消失し、大腸菌ファージは死滅するものとした。一方、消毒剤と有機物との反応特性に関しては、有機物の反応性に分布があることを仮定した。図6.11に示すように、正規分布を仮定し、各有機物粒子に対して、平均値0、標準偏差1の正規乱数からなる点数を付けた。その後、有機物を6つの群に分画して、それぞれに衝突したとみなす距離、衝突が可能な回数を設定した。消毒剤は、1回でも有機物に衝突すれば消費するものとした。

消毒剤と有機物が衝突した場合、有機物は副生成物となり染色体異常誘発性をもつものとした。このとき衝突回数に応じて染色体異常誘発性が強まるが、その寄与は衝突回数に比例する場合や指数関数的になる場合を仮定した。ここで、染色体異常試験は濃縮湖水を用いて行ったものである。湖水中有機物濃度の場合と同様に計算を行うと計算時間が膨大になるため、湖水中有機物濃度で行った、塩素消費実験、大腸菌ファージ不活化実験と対応するように、湖水中と濃縮湖水中における有機物個数と消毒剤個数の割合を一致させた。すなわち、湖水中では塩素は0.1mg/lを1000個としたが、濃縮湖水中では1000mg/lを1000個(10,000,000個とすべきところ)とし、湖水中では有機物は $E_{260}=0.02$ を4000個としたが濃縮湖水中では $E_{260}=9.0$ なので180個(1,800,000個とすべきところ)とした。これに伴い、有機物と消毒剤との衝突可能回数は、湖水中有機物濃度の場合の20倍とした。

(3) 実験結果との比較

塩素による反応を再現するための各パラメータの値を表6.2に示す。塩素消費を

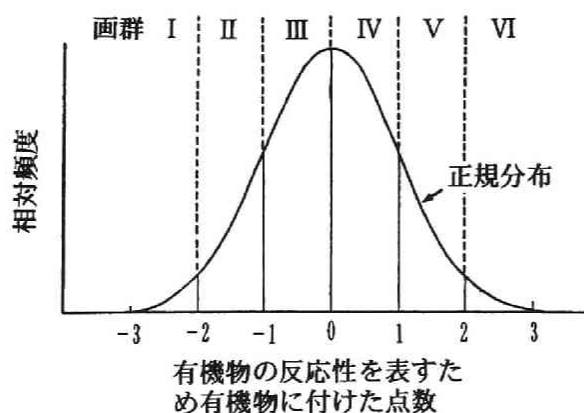


図6.11 有機物の反応性の分布

計算したものは図6.1中に示した。大腸菌ファージの不活化を計算した結果を実験結果とともに図6.12に示すが、実験データは1分時と10分時のものしかないため、計算結果のうち1分、2分、3分、…の値をとりだしてこれをプロットしたものである。また、染色体異常誘発性を計算した結果を実験結果とともに図6.13に示す。塩素による反応は、有機物との反応における選択性が強いため、画群Ⅰの衝突可能距離が大きく、衝突可能回数も大きい。1回の塩素と有機物との衝突が、染色体異常誘発性に対する寄与率は、実験結果に適合する値として 1.5×10^{-2} (cte/50細胞)を得た。ただし、200回以上衝突された有機物は、それ以上染色体異常誘発性は強くないとしている。

オゾンの反応性に関する各パラメータの値を表6.3に示す。オゾン消費を計算したものを図6.2に、また大腸菌ファージの不活化、染色体異常誘発性を計算した結

表6.2 塩素の反応性

		画群Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ
有機物との反応	衝突可能距離	0.004 X20	X1/2	X1/10	X1/20	X1/40	X1/100
	衝突可能回数	52	1	1	1	1	1
	染色体異常誘発性	衝突回数 $\times 1.5 \times 10^{-2}$ (cte/50細胞) 但し200回以上の衝突はそれ以上寄与せず					
大腸菌ファージとの反応	衝突可能距離	0.055					

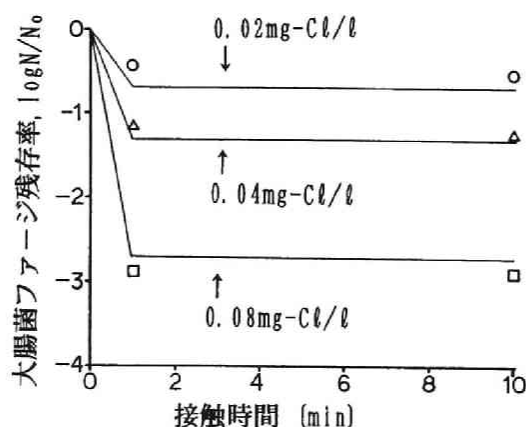


図6.12 塩素による大腸菌ファージの不活化

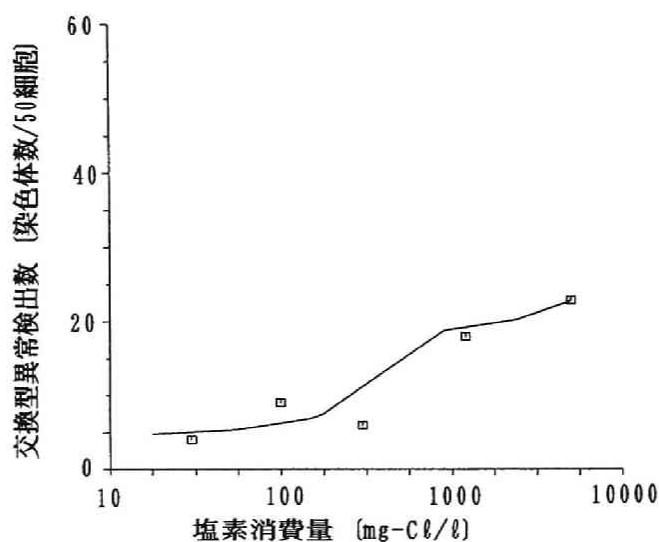
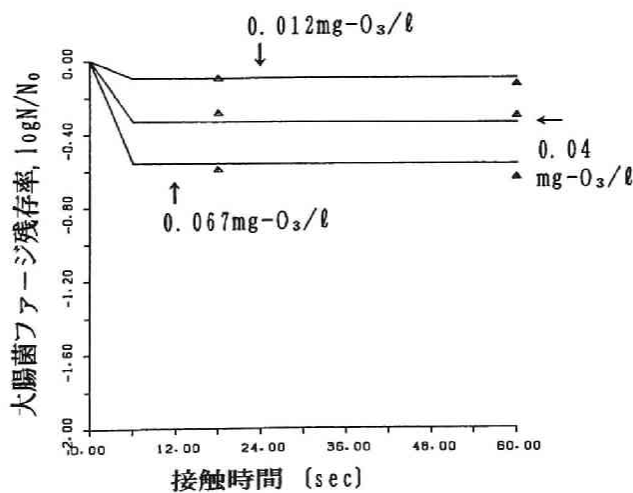


図6.13 塩素処理水の染色体異常誘発性

表6.3 オゾンの反応性

		画群 I	II	III	IV	V	VI	
有機物 との 反応	衝突可 能距離	0.010	x2.7	x1/2	x1/10	x1/20	x1/40	x1/100
	衝突可 能回数	2	2	2	2	2	2	2
	染色体異 常誘発性	1.2 ^{H-1} x1.36x10 ⁻³ (cte/50細胞) (Hは衝突回数で1以上の整数)						
大腸菌 ファージ との反応	衝突可 能距離	0.080						



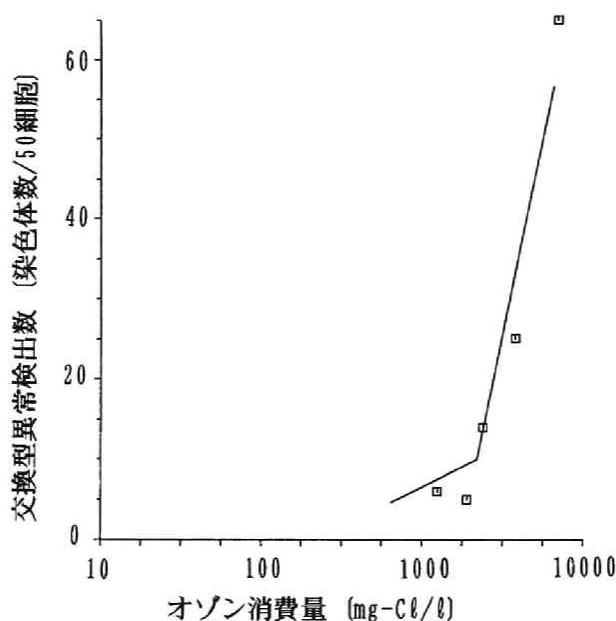


図6.15 オゾン処理水の染色体異常誘発性

果を実験結果とともに図6.14, 図6.15に示す。オゾン反応生成物の染色体異常誘発性は、1回の衝突では 1.36×10^{-3} (cte/50細胞)と、塩素反応の 1.5×10^{-2} (cte/50細胞)の1/11にすぎないが、複数回衝突すると染色体異常誘発性に対する寄与は比例的ではなく、指数関数的に寄与するとすれば実験結果を再現できた。

二酸化塩素の反応性に関する各パラメータの値を表6.4に示す。二酸化塩素消費を計算したものを図6.3に、また大腸菌ファージの不活化、染色体異常誘発性を計算した結果を実験結果とともに図6.16, 図6.17に示す。染色体異常誘発性は、1回

表6.4 二酸化塩素の反応性

		画群 I	II	III	IV	V	VI	
有機物との反応	衝突可能距離	0.010	x20	x2	x1/10	x1/20	x1/40	x1/100
	衝突可能回数	52	13	1	1	1	1	
	染色体異常誘発性	衝突回数×3.0×10 ⁻³ (cte/50細胞)						
大腸菌ファージとの反応	衝突可能距離	0.080						

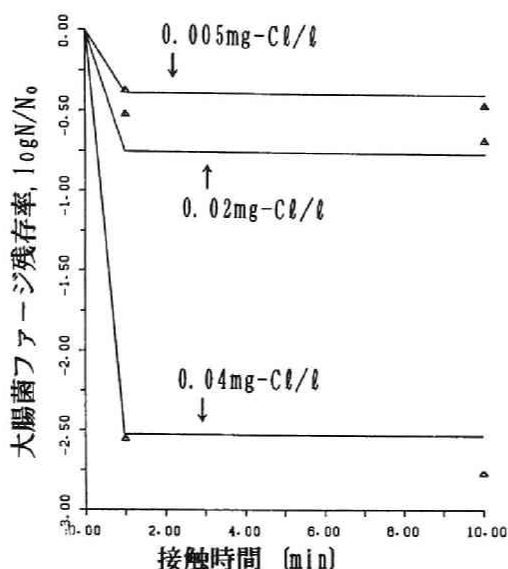


図6.16 二酸化塩素による大腸菌ファージの不活化

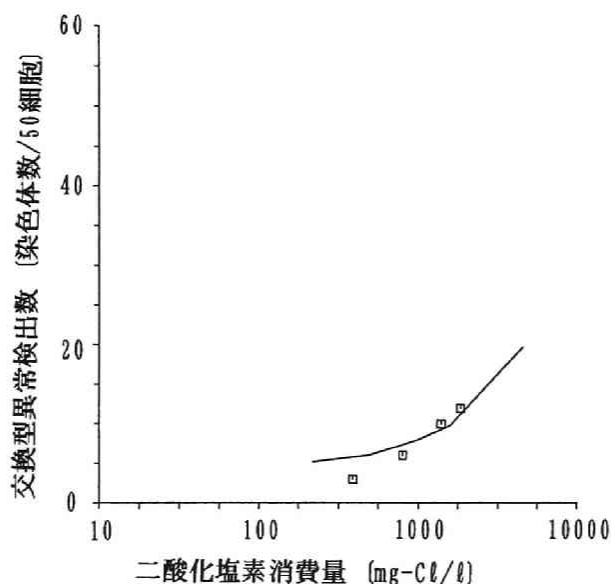


図6.17 二酸化塩素処理水の染色体異常誘発性

の衝突で 3.0×10^{-3} (cte/50細胞) が生起し、衝突回数に比例して染色体異常誘発性をもつとみなされた。1回の衝突で生起する染色体異常誘発性の強さは塩素の $1/5$ である。

クロラミンの反応性に関する各パラメータの値を表6.5に示す。クロラミン消費を計算したものを図6.4に、また大腸菌ファージの不活化、染色体異常誘発性を計算した結果を実験結果とともに図6.18、図6.19に示す。

表 6. 5 クロラミンの反応性

		画群 I	II	III	IV	V	VI
有機物との反応	衝突可能距離	0.0016 X20	X1	X1/10	X1/20	X1/40	X1/100
	衝突可能回数	5	5	1	1	1	1
	染色体異常誘発性	なし					
大腸菌ファージとの反応	衝突可能距離	0.0045					

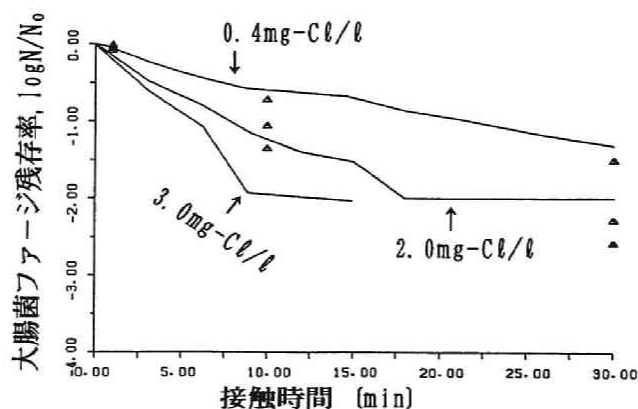


図6.18 クロラミンによる大腸菌ファージの不活化

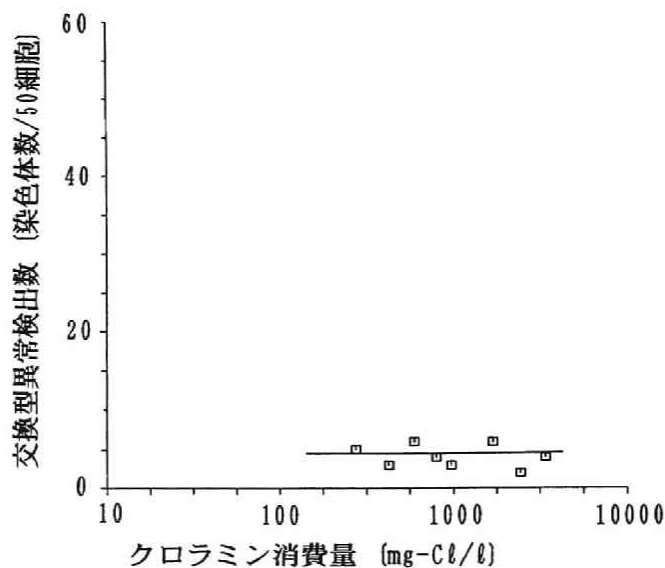


図6.19 クロラミン処理水の染色体異常誘発性

3. 3 残留特性と微生物の不活化力に関する計算結果

以上のモデルを用いて、各消毒剤の残留性および再汚染微生物に対する残留消毒剤による不活化効果を比較する。

(1) 大腸菌ファージ

湖水中に各消毒剤を0.5, 0.7, 1.0mg/l注入した場合を想定し、経過時間と残留濃度との関係を計算によって求めたものを図6.20, 図6.21, 図6.22, 図6.23に示す。図6.21から、オゾンは数10分で消費されることがわかる。図6.22より、塩素と比較すると二酸化塩素の消費速度も速いが、残留性もあることが示されている。一方、

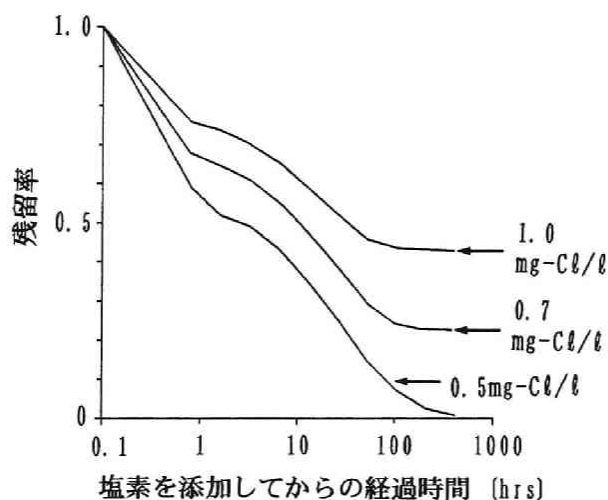


図6.20 塩素の残留性

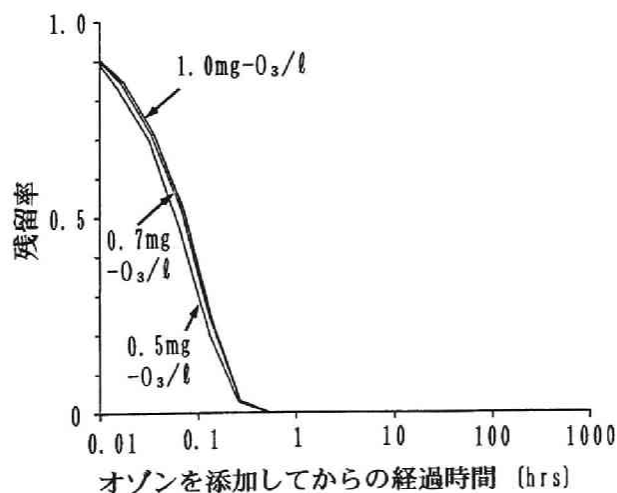


図6.21 オゾンの残留性

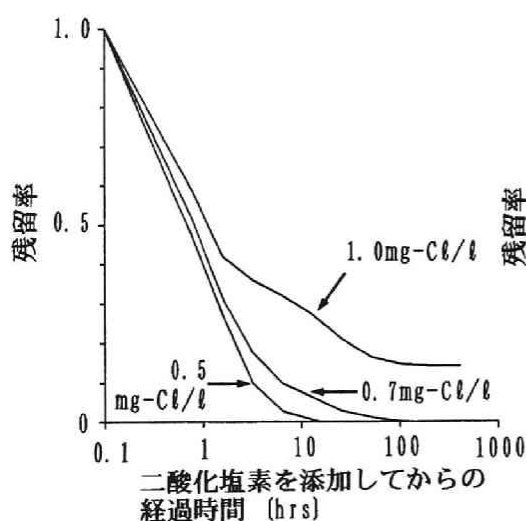


図6.22 二酸化塩素の残留性

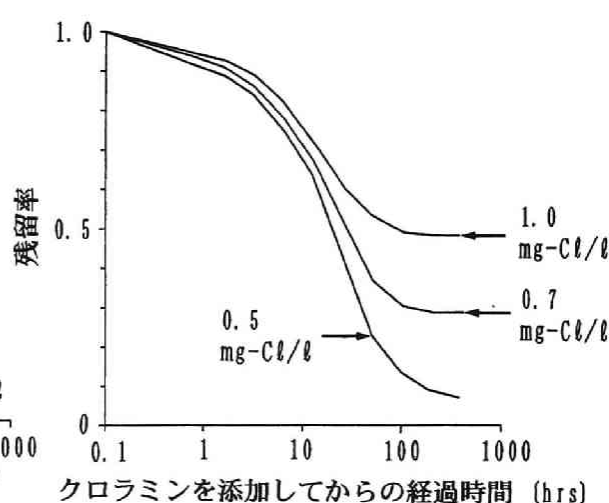


図6.23 クロラミンの残留性

塩素とクロラミンはよく残留することがわかる。

さて、消毒処理水の微生物的な安全性を評価するためには、給水過程での再汚染を想定し、その不活化力を比較する。すなわち、消毒剤を注入した後のある経過時間において再汚染が発生したとし、これに消毒処理水がいかに対応できるかをみてる。ここでは、消毒剤間の違いが明示されるように、まず0.7mg/lを添加した場合を例としてとりあげる。0.7mg/lを添加した場合の、各経過時間における残留消毒剤によって、再汚染大腸菌ファージが10分間で不活化される量を計算したものを図6.24に示す。塩素処理水の場合、計算範囲内では、再汚染大腸菌ファージをすべて不活化できた。これらの結果は、ある時間が経過した後の各消毒処理水のもつ微生物的安全性の1つを表したものと見える。オゾンでは10分以上経過後は大腸菌ファージに対する不活化力を失い、微生物的安全性が保てなくなることがわかる。二酸化塩素も消毒剤消費に伴い、不活化力がなくなる。クロラミンは残留性はあるものの、不活化力が弱いため、短時間での不活化効果は期待できない。一方、塩素は残留性もあり、不活化力も強いため、消毒処理水の微生物的安全性に対する信頼性は最も高いといえる。

(2) *E. coli*

同じモデルを*E. coli*の不活化に適用した。*E. coli*の不活化実験は緩衝液中で行っ

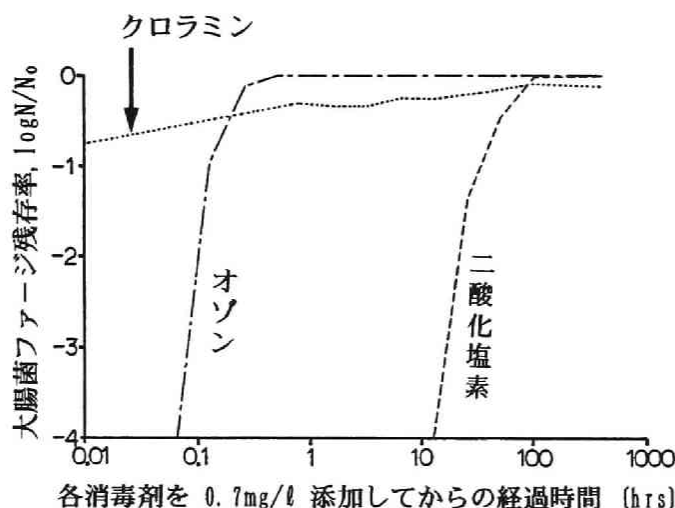


図6.24 残留消毒剤による再汚染大腸菌ファージの不活化
(再汚染後10分経過時の残存率)

ているので、有機物の共存はないものとした。実験結果との適合性の例を図6.25, 図6.26, 図6.27, 図6.28に示し、消毒剤と*E. coli*との衝突可能距離を表6.6に示す。衝突可能距離は、生菌のみを測定対象とした場合と、測定対象に回復可能菌を含めた場合ではそれぞれ値が異なっているが、生菌のみを測定対象とした場合の方が、不活化がより進行するように測定されるので衝突可能距離もより大きい。

つぎに、一旦消毒処理を受けた菌の砂ろ過水中での回復と再増殖については、第5章図5.4の結果を用いる。モデル化にあたって、生菌と回復可能菌の挙動について、図5.4の結果を再度考察してみる。まず1時間までは、塩素との接触の影響が残存した結果、全体の菌数に変化はないものの、生菌に対するストレスが進行し回復可能菌の割合が増大している。ついで1時間後から9時間後までは生菌の割合が増大しており、回復可能菌のうち回復して生菌となったものがあることを示している。さて、9時間後以降は生菌数は増大しているが全体の菌数も増大している。生菌数は、経過時間0においては210 N/mlであったものが、24時間後には49,000 N/mlに増大している。仮に、全体の菌数の増大には、生菌の増殖のみが寄与するとすると、全体菌数は経過時間0において34,000 N/mlであるので、24時間後には82,790 N/mlとなるはずである。しかし、実際には640,000 N/mlとはるかに多く、生菌数のみならず回復可能菌数も増大していることがわかる。

ここで、回復可能菌の砂ろ過水中での挙動を調べるためつぎの実験を行った。TL

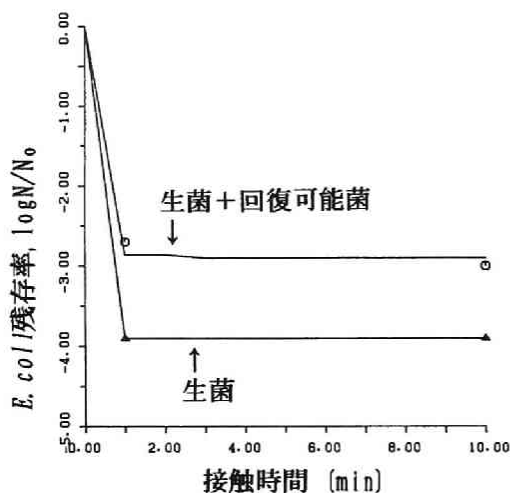


図6.25 塩素による*E. coli*の不活化

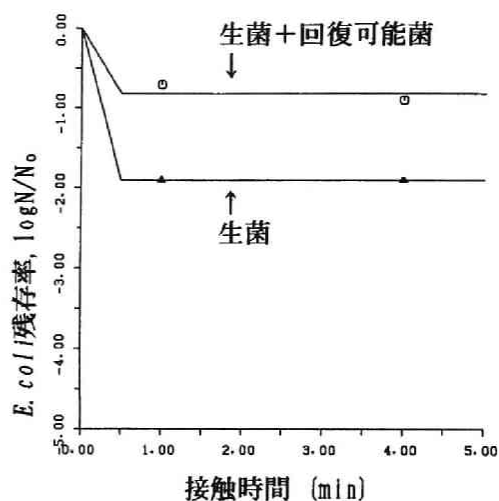


図6.26 オゾンによる*E. coli*の不活化

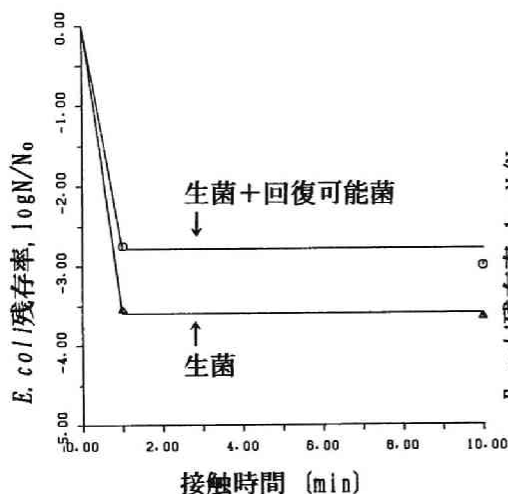


図6.27 二酸化塩素による*E. coli*の不活化

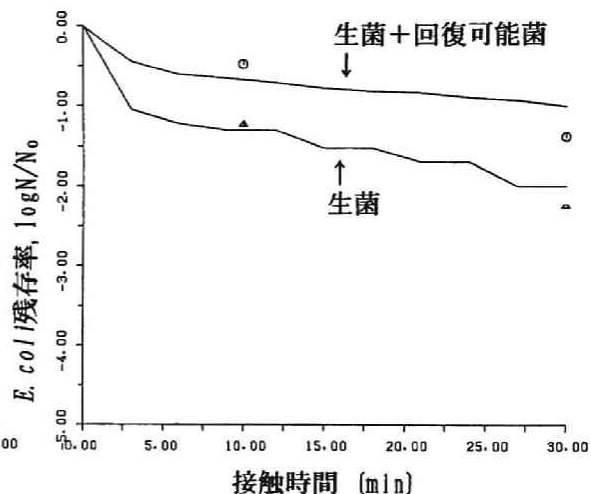


図6.28 クロラミンによる*E. coli*の不活化

表6.6 消毒剤と*E. coli*との反応性

	生菌	生菌+回復可能菌
塩素	0.060	0.051
オゾン	0.21	0.13
二酸化塩素	0.089	0.086
クロラミン	0.0205	0.0135

値は不活化モデルにおける消毒剤と*E. coli*との衝突可能距離を示したもの

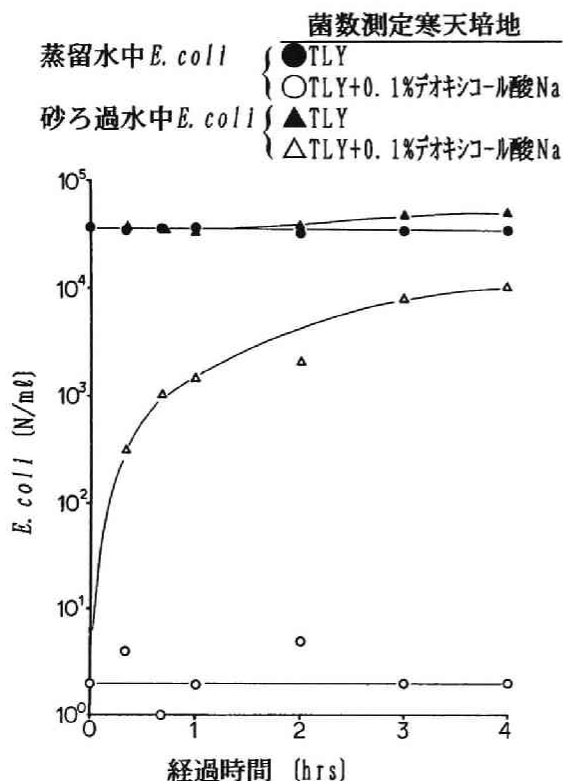


図6.29 蒸留水による被ストレス菌の砂ろ過水中での回復

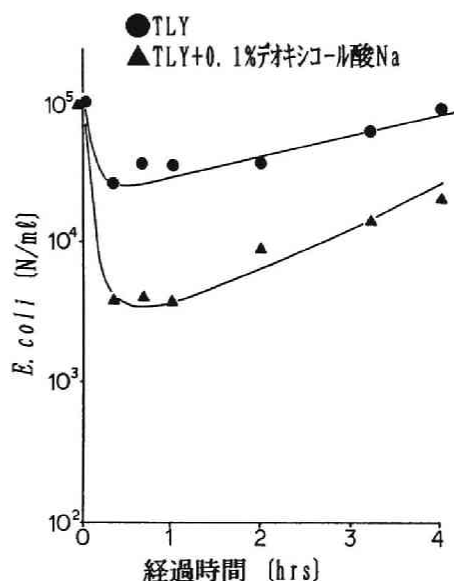


図6.30 生菌の砂ろ過水中での挙動

Y液体培地中で対数増殖期にある *E. coli* を蒸留水で3回遠心分離洗浄した後、さらに蒸留水中に3時間放置する。この *E. coli* 液 1 ml を、一方は蒸留水 1 l に添加し、一方は砂ろ過水 1 l に添加してそれぞれ菌数の経時変化を調べた。結果を図6.29に示す。砂ろ過水中では速やかな回復がおこり、全体の菌数も増加している。これに対し、蒸留水中では回復も増殖もおこらない。この実験では4時間後までしか菌数を測定していないが、生菌数が増大しない条件下では、回復可能菌が増大し全体の菌数が増大することもないと推察できる。さらに、生菌の砂ろ過水中での挙動を調べるため以下の実験を行った。TLY液体培地中で対数増殖期にある *E. coli* を砂ろ過水 500 ml に添加して菌数の経時変化を調べた。結果を図6.30に示す。この結果、生菌が砂ろ過水に接触する過程でも回復可能菌が生成することがわかった。

以上の結果、図5.4では、①回復可能菌が回復して生菌となる過程、②生菌が増殖する過程、③生菌が砂ろ過水中でストレスを受けて回復可能菌となる過程、が含まれるものとする。回復可能菌自体が増殖する可能性や、死滅する可能性も否定

できないが、ここでは無視する。したがって図5.4の実験結果に対し以下のようにモデル化する。

$$\frac{dN_1}{dt} = qN_1 + \alpha N_2 - \beta N_1 \quad (3)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = -\alpha N_2 + \beta N_1 \quad (4)$$

ここに、 N_1 ：生菌数（N/ml）， N_2 ：回復可能菌数（N/ml）， t ：経過時間（hr）， q ， α ， β は定数（hr⁻¹）である。(3)式右辺第1項は砂ろ過水中での生菌の増殖を表し、第2項は回復可能菌が回復して生菌となる量、逆に第3項は生菌が砂ろ過水中でストレスを受けて回復可能菌となる量を表す。 α は、蒸留水中でストレスを与えた*E. coli*が砂ろ過水中で回復する速度で表すものとし、図6.29中の△印の初期速度から $\alpha = 9.7 \times 10^{-4}$ （hr⁻¹）を得た。 β は、TLY液体培地中*E. coli*（生菌）が砂ろ過水中で回復可能菌となる速度で表すものとし、図6.30中の▲印の初期速度から $\beta = 0.70$ （hr⁻¹）を得た。これらの値を用いて図5.4にフィットする q の値を求めて1.2（hr⁻¹）を得た。これより*E. coli*（生菌）の世代時間を計算すると35分となり、第5章で示した表5.3の値と比較するとやや長いものの、 q の値はほぼ通常の*E. coli*の増殖速度を表しているといえる。

以上の結果を用いて、各消毒剤を0.7mg/l添加してから一定時間経過した後、全体の90%が回復可能菌で生菌数が N_0 である再汚染が発生したとし、さらに24時間が経過したときの残存菌数を推定した。まず、各消毒剤を0.7mg/l添加してから一定時間経過した後の残留消毒剤濃度を図6.20、図6.21、図6.22、図6.23のように計算する。ついで上で作成した*E. coli*の不活化モデルにより、その残留消毒剤濃度によって、24時間で不活化できる*E. coli*数を求めた。この過程でもし消毒剤が消費すれば、その時点から、(3)、(4)式で表される回復と再増殖が始まるものとした。計算結果を図6.31に示す。たとえば、オゾンで0.7mg/l添加して1時間経過してから再汚染がおきた場合、すでに消毒力はないので、さらに24時間経過後には、0.1%デオキシコール酸Na含有TLY寒天培地の測定値で表される生菌数、およびTLY寒天培地の測定値で表される全体の菌数がともに増大し、初期値よりも大きな値となることを示している。塩素は、計算時間（消毒剤を添加してから400時間）の範囲内ではなお残留しているので、*E. coli*は不活化され続け、回復と再増殖は起こらない。同様にクロラミンも残留しており、不活化のみが進行する。24時間経過後は不活化は十

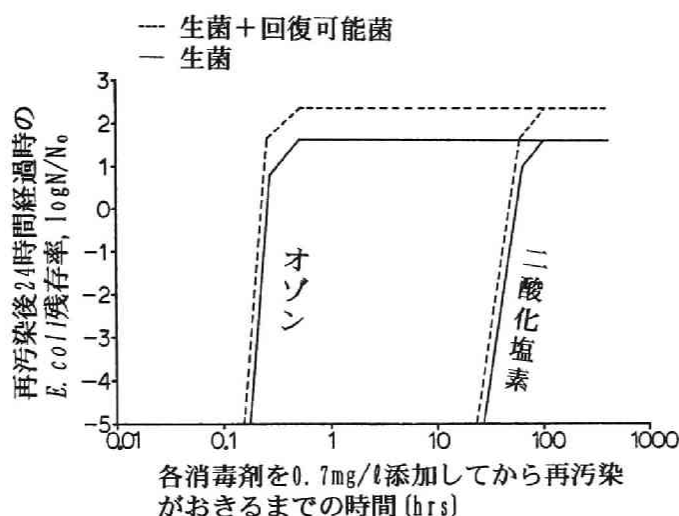


図6.31 再汚染*E. coli*に対する残留効果の推定

分進行しているので、図6.31には残存菌数を表す曲線は表れていない。ただしクロラミンの場合、瞬時の不活化は期待できないことはすでに指摘した通りである。

図6.31の特徴は、残存菌数を示す曲線が、横軸に垂直な直線に近いことであり、これは、消毒剤が少しでも残留していれば、回復と再増殖はおきえないことを示している。これはとりもなおさず、消毒剤にとってその残留性がいかに重要であるかを再確認させるものといえる。結局回復と再増殖が始まりうる時間は、各消毒剤の残留時間に依存することになり、塩素とクロラミンの信頼性が高い。一方二酸化塩素については、残留性はあるものの、残留時間は塩素よりも短い。

回復と再増殖に関する以上の解析では、各消毒剤の残留特性と、回復、再増殖の発生、規模との関係はいかに見積もれるか、について検討した。その結果、消毒剤が少しでも残留すれば回復と再増殖はおきえないことを指摘した。結局、大腸菌ファージの不活化特性で得られた結果に対し、消毒剤の残留性の重要性を改めて確認する結果となった。

3. 4 染色体異常誘発性の計算結果

消毒処理水の安全性には、以上述べた微生物的安全性の他に消毒副生成物による安全性を加味しなければならない。上と同様に水中に各消毒剤を0.5, 0.7, 1.0mg/l注入した場合を想定し、生起する染色体異常誘発性を経時的に求めた。結果を図

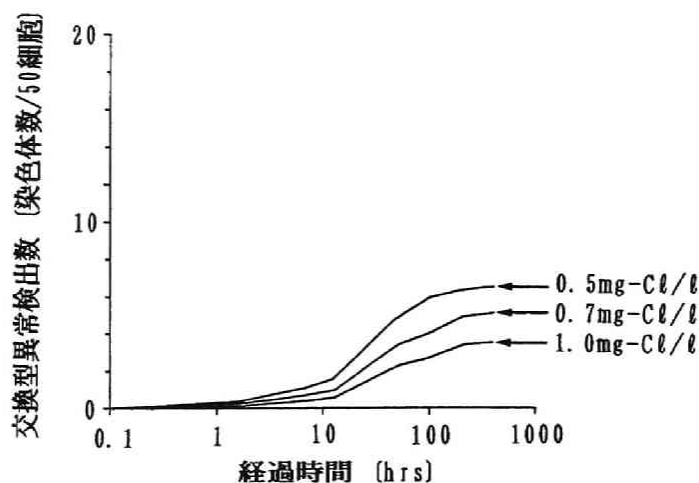


図6.32 塩素処理による染色体異常誘発性の生成

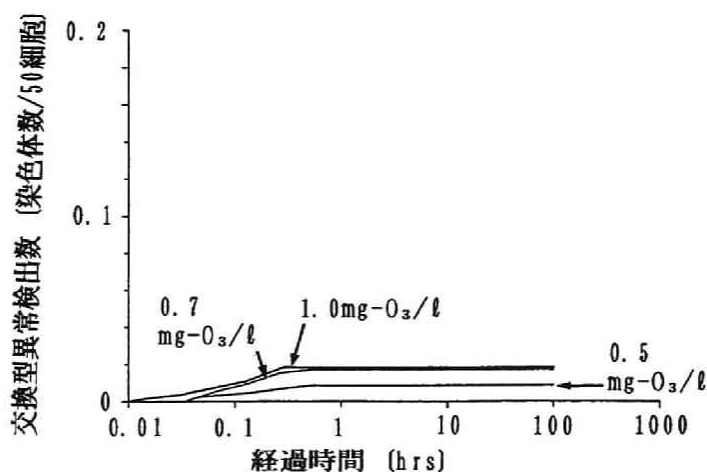


図6.33 オゾン処理による染色体異常誘発性の生成

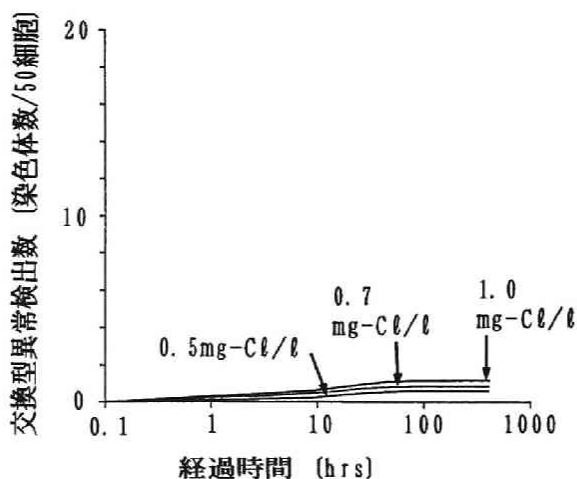


図6.34 二酸化塩素処理による染色体異常誘発性の生成

6. 32, 図6. 33, 図6. 34に示す。単位は濃縮湖水中での染色体異常誘発性を表す[交換型異常検出数/50細胞]をそのまま用いており、またコントロールの4. 5/50細胞を差し引いた、染色体異常誘発性の生起量として表示した。クロラミンを除く各消毒剤ともに、水中での消費に伴い染色体異常誘発性が生成する。なおオゾン処理水の染色体異常誘発性を示した図6. 33の縦軸のスケールは、図6. 32, 図6. 34の1/100で表している。

3. 5 モデルを用いた消毒処理水の安全性の検討

これまでの結果から、再汚染大腸菌ファージに対する消毒処理水の不活化力と、処理水の染色体異常誘発性を経時的に整理してみる。消毒剤注入後1時間後、10時間後、100時間後を例にとってまとめたものを表6. 7に示す。消毒処理水の微生物的安全性が確保されているかは、再汚染大腸菌ファージに対し、これを短時間で不活化できるかどうかで評価する。このため表6. 7では、再汚染が発生してから10分後の大腸菌ファージの残存率が示してある。また、染色体異常誘発性は、消毒処理水の副生成物に対する安全度を表すものである。

注入1時間後では、まず塩素処理水と二酸化塩素処理水とは、残留してしかも不活化力が大きいため再汚染大腸菌ファージを十分不活化できる。クロラミン処理水は、不活化効果は十分ではない。クロラミンは残留しているので、不活化効果が十分でない理由は、その不活化力が小さいためである。またオゾンはすでに残留しないので、オゾン処理水の不活化効果が全くなくなっている。クロラミンにも不活化力はあるが、残存大腸菌ファージが塩素処理水、二酸化塩素処理水のような低いレベルに達するには何時間も要することになり、消毒処理水の微生物的安全性を確保するという点からは好ましくない。すなわち、クロラミン処理水は、消毒処理水としては適さないと判断しうる。また、染色体異常誘発性を比較すると、塩素処理水が二酸化塩素処理水よりもやや強く、オゾン処理水はそれらよりもはるかに弱い。以上の結果、注入1時間後では、消毒処理水としては、二酸化塩素処理水が塩素処理水よりもやや適し、クロラミン処理水とオゾン処理水は適さないと判断できる。

注入10時間後では、塩素処理水と二酸化塩素処理水は、十分な不活化効果があるものの、染色体異常誘発性を比較すると二酸化塩素処理水は塩素処理水の1/2程度であり、二酸化塩素処理水の方がより好ましいといえる。クロラミン処理水とオ

表6. 7 消毒処理水の微生物的安全性と副生成物による安全性の時間的变化

1時間後

	再汚染大腸菌ファージ に対する不活化力 (再汚染10分後の残存率)	染色体異常誘発性 (交換型異常数 /50細胞)	消毒処理 水としての 適否*
塩素	$<10^{-4}$	0.25	△
二酸化塩素	$<10^{-4}$	0.2	○
クロラミン	0.49	0	×
オゾン	1.0	0.017	×

10時間後

	再汚染大腸菌ファージ に対する不活化力 (再汚染10分後の残存率)	染色体異常誘発性 (交換型異常数 /50細胞)	消毒処理 水としての 適否*
塩素	$<10^{-4}$	0.90	△
二酸化塩素	$<10^{-4}$	0.46	○
クロラミン	0.58	0	×
オゾン	1.0	0.017	×

100時間後

	再汚染大腸菌ファージ に対する不活化力 (再汚染10分後の残存率)	染色体異常誘発性 (交換型異常数 /50細胞)	消毒処理 水としての 適否*
塩素	$<10^{-4}$	4.0	△
二酸化塩素	1.0	0.82	×
クロラミン	0.58	0	×
オゾン	1.0	0.017	×

* ○適する
△やや適する
×適さない

ゾン処理水は、消毒処理水としては適さない。

注入100時間後では、塩素は依然残留し不活化効果を発揮する一方、図6.22に示したように二酸化塩素は消費する結果、二酸化塩素処理水の不活化効果はなくなる。染色体異常誘発性をみると、二酸化塩素処理水は塩素処理水の約1/5と小さいものの、微生物に対する防御効果がない以上、消毒処理水としては適さないことになる。

以上、消毒処理水のもつ微生物的安全度と、副生成物に対する安全度を、経時的に例示した。その結果、まずクロラミンとオゾンは、微生物的安全性を十分確保できないことから、消毒剤としては適しないと判断できた。そして塩素と二酸化塩素については、二酸化塩素が残留している領域では二酸化塩素処理水の方がより好ましい処理水といえる。しかし、二酸化塩素の残留性が十分確保されないならば塩素を使わざるをえないことになる。ここでは塩素と二酸化塩素との違いを明確にするため注入量0.7mg/lの場合を例示したが、図6.22に示したように二酸化塩素も残留する性質そのものはあるので、残留性が確保されるような注入コントロールは可能であろう。結局、残留性が確保されるように処理が行われれば、二酸化塩素は優れた消毒剤であるという前節の結論を支持する結果となった。

第4節 消毒処理水の安全性に関する総合的考察

第1章第1節で述べたように、本研究では、消毒処理水の安全性を、①消毒副生成物による有害性、②消毒剤の微生物に対する不活化力、③消毒剤そのものの残留性、の3つの特性によって評価している。①消毒副生成物による有害性は、哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験によって検討した。②消毒剤の微生物に対する不活化力は、大腸菌ファージの不活化実験によって検討した。実験は琵琶湖水中有機物が存在する条件下で行った。③消毒剤そのものの残留性は、琵琶湖水中有機物の存在する水中で調べた。これらの実験結果をまとめたものが表6.1であった。また、消毒剤の不活化力と残留性の重要性について考察するためモデルを用いて検討し、表6.7を得ている。そこで本節では、消毒剤の特性を検討した既往の研究を参照し、本研究結果と比較することにより、本研究で明らかになった点を指摘し、また本研究結果の限界や今後の課題点を提示する。

表6. 8 消毒方法の評価例⁵⁾

	消毒効果	副生成物	変異原性	コスト
塩素	3	4	4	1
二酸化塩素	2	3	2	3
クロラミン	4	2	3	2
オゾン	1	1	1	4

1 : 最も優れている、 4 : 最も劣っている

表6. 9 消毒方法の評価例 (文献6) を整理したもの)

	消毒効果	副生成物	残留性	臭味	コスト	操作性
塩素	3	3	1	3	1	1
二酸化塩素	2	2	2	2	2	2
オゾン	1	1	3	1	3	3

1 : 最も優れている、 3 : 最も劣っている

消毒剤の特性の検討例を表6. 8⁵⁾、表6. 9⁶⁾に示す。表6. 8は、米国EPAのLykinsらがミシシッピ川の水を対象として行った研究結果をまとめたものであり、表6. 9は、既往の研究成果をもとに金子がまとめたものである。

まず、消毒効果については、表6. 8、表6. 9ともに、オゾンの効果が最大で、ついで二酸化塩素、塩素の順で、クロラミンの効果が最も小さい評価となっている。なお、表6. 8の中の消毒効果は、第4章に示した表4. 8をもとに評価されたものである。本研究において、琵琶湖水中有機物が共存する条件下で大腸菌ファージの不活化実験を行った結果では、表6. 1に示したように、二酸化塩素の不活化効果が最大で、ついで塩素、オゾンの順で、クロラミンの効果が最も小さい結果となった。従来の結果と比較すると、オゾンの不活化効果が大きく低下し、塩素よりも小さくなった点が特徴であった。この理由としては、第4章で従来の研究結果とあわせて考察したように、有機物との反応性に富むオゾンが水中で消費された結果、不活化効果が大きく低下したことが考えられた。

本研究で得られた結果、および表6. 8、表6. 9に示された結果に共通しているのは、オゾン以外の3種の消毒剤の不活化力を比較した場合、その強さは、二酸化塩素、塩素、クロラミンの順となる点である。

表6.10 消毒処理水の健康影響に関する予備的検討結果⁵⁾

処理	変異原性 [変異数/ℓ]	DNA鎖切断 [切断数/細胞・ℓ]
原水	142±18	44.5±0.2
塩素	4185±181	680.9±5.0
オゾン+塩素	2152±78	311.3±7.0
クロラミン	1420±31	201.8±3.0
オゾン+クロラミン	972±36	76.0±4.0

つぎに、処理水の変異原性について表6.8では、塩素処理水の変異原性が最も強く、ついでクロラミン処理水、二酸化塩素処理水の順で、オゾン処理水の変異原性が最も弱いという評価になっている。これは表6.10に示した結果⁵⁾などをもとに整理されたものであるが、第3章第1節で既往の研究を示した表3.1の中の代表的結果と一致している。ここで、LykinsらのAmes試験に対する試料の作製方法は、消毒処理水をXAD-2、XAD-8に通水し、吸着物質をアセトンで抽出してこれを蒸発濃縮する方法が採られている⁷⁾。したがって、やはり副生成物のうち親水性の物質は樹脂に吸着しにくいであろうし、揮発性物質も最終的に試料中にはいってこないという問題点がある。消毒処理水をXAD-2、XAD-8に通水した段階での、TOCでみた捕捉率は、約40%であったと報告されているものの、脱離率やその後の蒸発濃縮等を含めた全操作の回収率は不明であり、かなり低いと考えられる。これに対し本研究では、まず変異原性試験として哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験を行っていることを特徴とする。また、消毒処理に先立って濃縮操作を行い、消毒処理水をそのまま染色体異常試験の試料とし、副生成物全体の染色体異常誘発性を調べたのも特徴である。その結果、染色体異常誘発性の強さは、塩素処理水、二酸化塩素処理水、オゾン処理水、クロラミン処理水の順であった。この結果を従来の結果と比較した場合、先に述べた試料調製方法における問題点があるために確かなことは指摘しにくいだが、二酸化塩素処理水とオゾン処理水の染色体異常誘発性が相対的に強い結果となっているのが特徴といえるようである。その理由としては、消毒処理の対象水が異なるため、あるいは、Ames試験ではなく哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験による結果であるためなどの可能性も否定できないが、最も大きなものとしては、変異原性試験のための試料の作製方法の違いによると考えられる。すな

わち、二酸化塩素処理水とオゾン処理水の染色体異常誘発性が相対的に高かったのは、従来の、消毒処理後に濃縮する方法では回収できなかった、親水性の副生成物をも染色体異常試験の対象物質に含めることができたためと推察できる。しかし本実験の方法では、消毒処理の対象物質が、自然水中物質のうちXAD-2樹脂に吸着しかつジエチルエーテルで抽出可能である疎水性の物質に限られており、新たな問題点ともなる。

本研究結果と既往の研究でよくみられる結果を比較すると、変異原性試験に用いた生物材料の違い、試料作製方法の違いがあるが、共通している点は、塩素処理水の変異原性が最も強く、他の3種の変異原性は塩素処理水よりも弱いことである。また、二酸化塩素処理水とオゾン処理水とを比較すると、変異原性はオゾン処理水の方が弱いという点も共通している。

本研究では、消毒処理水の有害性を測定するために、総括的水質指標としての変異原性試験を採用している。これに対し、消毒処理水中の有害性が推定される主要な副生成物を分析することによって、処理水の有害性を推定しようとするアプローチがある。消毒処理水中の副生成物については、分析技術の高度化とともにさまざまな有害副生成物が同定されてきている^{8) 9) 10) 11)}。これらの副生成物のうち、どれが有害性が強く消毒処理水の有害性を表す指標として適切であるかを常にチェックする必要がある。そこでは副生成物と変異原性との相関関係、変異原性の強さなどを試験する必要がある、変異原性試験に大きく依存することになる。またこうして着目すべき副生成物が指摘された場合、消毒処理水の変異原性試験においては、該当する副生成物が試料水に確実に含まれるような試料作製方法を採用する必要がある。このように、消毒処理水の有害性を、変異原性試験によって測定する方法と副生成物の分析によって推定する方法とは、相互に補完しあう性格のものであると考える。

異なる消毒剤で処理した処理水の有害性を比較する目的においても、変異原性試験の他に、ある副生成物を測定しその生成量の多少から有害性を比較する手法が採られ、指標物質としてはトリハロメタンや全有機ハロゲン化合物が多用されてきた。表6.8で副生成物生成量を比較しているのもその例である。また4種の消毒剤すべての比較には至らないが、最近では、アルデヒド類^{12) 13)}や含窒素化合物¹⁴⁾にも着目されるようになってきた。しかし、4種の消毒処理水の有害性を比較するための適切な指標物質が確立されているわけではなく、検討した例もない。本研究で

は、4種の消毒処理水の有害性を比較するためにはいかなる物質に着目すべきかについていくつかの検討を行っている。まず、第3章では、消毒処理水の染色体異常誘発性を調べるとともに、処理水中の2, 3の副生成物を測定し、消毒処理水の染色体異常誘発性に対する寄与について考察した。ここに結果を再整理すると、

①消毒処理によって生成したクロロホルムと $C_0 \sim C_3$ 直鎖低分子アルデヒドは、いずれも、処理水の染色体異常誘発性にはほとんど寄与しない。

②特に、pHを変化させて塩素処理を行った結果、塩素処理水の染色体異常誘発性とクロロホルム生成量とは逆傾向を示し、他の有機塩素化合物または他の酸化生成物の寄与が示唆された。

それでは染色体異常を誘発する副生成物として何に注目すればよいか。この問題に対するアプローチのひとつとしては、染色体異常誘発性の原因を個々の化合物に求めるのではなく、官能基を中心とする原子団に注目し、検討する方法があろう。この検討の結果は付録として掲載している。付録では、まず、既存の染色体異常試験データを解析することにより、化合物中にニトロ基とカルボニル基が含まれれば染色体異常誘発性に寄与する可能性が高いことを指摘している。ついで、各消毒処理によってニトロ基、カルボニル基がいかに生成するかを調べ、処理水の染色体異常誘発性との関係について実験的に検討して以下の結論を得ている。

①消毒処理水の染色体異常誘発性に対するカルボニル化合物の役割は重要である。

その主たる理由は、(a)含有カルボニル基量が多いほど染色体異常誘発性も強いこと、(b)カルボニル基の選択的還元処理によって処理水の染色体異常誘発性が大きく低下したこと、である。先に第3章の実験結果をまとめて、 $C_0 \sim C_3$ 直鎖低分子アルデヒドの寄与はほとんどないことを述べた。例えば、オゾン処理水においては、これら低分子アルデヒドの生成量はアルデヒド基炭素量で5 mg/l以下(図3.15)であり、その染色体異常誘発性に対する寄与はほとんどないと第3章では推定した。しかし、カルボニル基全体では210 mg/lも生成(付図3, オゾン消費量6000 mg- O_3 /lまでの範囲)しているのであり、カルボニル化合物全体が染色体異常誘発性に寄与していると推定できたものである。他の消毒処理水についても同様である。

②染色体異常誘発性に対するニトロ化合物の寄与は小さいと推定される。

③塩素処理水の染色体異常誘発性については、カルボニル化合物の寄与の他、処理水中の有機塩素化合物の種類が大きく影響する。

すなわち、オゾン処理水、二酸化塩素処理水、クロラミン処理水の3種については、その染色体異常誘発性にカルボニル化合物が大きく寄与していると考えられ、カルボニル化合物がこれらの処理水の有害性を比較する大まかな指標になりうることを指摘している。また、塩素処理水の染色体異常誘発性は、含有カルボニル基量から推定される他の3種の処理水の7倍～10倍の強さであり、これには有機塩素化合物が寄与していることを指摘している。このうち、二酸化塩素処理水、クロラミン処理水について、カルボニル化合物がその有害性の指標になりうることを指摘していることは、これら処理水の染色体異常誘発性に対する有機塩素化合物の寄与が小さいことをも意味する。すなわち、有害性の指標としてトリハロメタンや全有機ハロゲン化合物だけを測定した場合、二酸化塩素処理水、クロラミン処理水の有害性を過小評価する可能性がある。付録の実験結果からは、

二酸化塩素、クロラミン、オゾン…カルボニル基生成量

塩素

…カルボニル基生成量×7～10

を指標とすれば、消毒処理水の有害性の大まかな比較が可能になることがわかった。

さらに、このような消毒処理水の変異原性に対する副生成物の寄与に関する検討は、消毒処理水の変異原性試験における試料調製方法に対しても有益な情報を与えるものと思われる。消毒処理水の変異原性試験を行う上で、その試料調製方法には大きな課題が残されていることを述べた。しかし、従来の研究で用いられてきた、自然水を消毒処理した後に濃縮する方法、あるいは本研究で用いた、自然水を濃縮した後に消毒処理する方法、ともに、水中物質を平等に濃縮できなければ問題点は残り続けることになる。しかし、ホルムアルデヒドのような親水性低分子物質からフミン質に至る広範な物質を変異原性試験に適した形で濃縮することは極めて困難であろう。この問題を解決するには、やはり消毒処理水の変異原性に対する副生成物の寄与に目を向けることが必要であろう。Meierら¹⁵⁾は、試薬フミン酸を用いた実験により、塩素処理水の変異原活性の80%以上は不揮発性成分であったと報告している。この例のように最近、塩素処理水中の変異原活性の多くは不揮発性画分に存在することが認識されつつある⁸⁾。塩素処理水中の強力な変異原物質であるMX (3-クロロ-4-ジクロロメチル-5-ヒドロキシ-2 (5H) -フラノン) も、不揮発性成分を高速液体クロマトグラフ分析しつつ変異原活性の存在する画分をみつける実験¹⁶⁾によって発見されたものである。一方、本研究では付録において、染色体異常誘発性に対する消毒副生成物の寄与に関して検討を行い、先述の結論を得ている。本

研究はこの後、実際の上水処理システムの中での消毒のあり方に関する研究に入るべきものであり、そこでは、消毒処理水→濃縮→染色体異常試験、という手順を踏むことになる。このとき重要なのは濃縮操作であるが、本研究結果によれば、まずカルボニル化合物の濃縮に重点をおく必要があることになる。

つぎに、表6.9をみると残留性の点では、塩素が最も優れており、二酸化塩素は塩素よりも劣っているという評価であるが、これは本章第1節の実験結果と一致している。また明らかなことではあるが、オゾンの残留性がない点も一致している。また本章第1節で、クロラミンと塩素の残留性を調べた佐藤の実験⁴⁾を引用して本研究の実験結果と比較したが、いずれもクロラミンの方が残留性の点では優れているといえた。ただし、本研究における結果、および既往の研究は、ともに実験条件上の課題を残している。本研究では、残留性実験は細口共栓試験瓶を用いて行い、静置中栓はしているものの、完全に気層をなくしての実験ではない。消毒剤の種類によって揮発性が異なるため、残留性を厳密に評価しようとするれば、浄水場内のような気層のある場、給水系統のような気層のない場など、各消毒処理水の存在する場を想定した検討が必要であろう。本研究、および既往の研究で採られた実験方法の範囲内ではあるが、残留性の点で最も優れているのはクロラミンであり、ついで塩素、二酸化塩素の順であるといえる。またオゾンの残留性はないといえる。

以上、消毒剤の不活化効果、消毒処理水の有害性、消毒剤の残留性、の3点について、本研究と表6.8、表6.9に示された結果とを比較し、本研究の特徴や不明確な点、方法論上の問題点、今後の課題点などを指摘した。ここで本研究の結果、および表6.8、表6.9に示された結果等をまとめて、消毒処理水の安全性を塩素処理水と比較すると、定性的に以下の点を指摘しうる。

1) 二酸化塩素

不活化力が塩素よりも大きく、しかも処理水の変異原性が塩素処理水よりも弱い点で、塩素よりも優れた消毒剤であるといえる。しかし、残留性は塩素よりも劣り、残留濃度に注意する必要がある。二酸化塩素そのものに残留性があるので、残留性を確保しつつ使用するならば、処理水の微生物的安全性を十分確保しつつ、副生成物による有害性が低い飲料水を供給することが可能である。

2) クロラミン

処理水の変異原性が塩素処理水よりも弱い点、および残留性が塩素よりも優れている点が長所である。しかし、不活化力は他の3種の消毒剤と比較して著しく劣る

点が短所である。

3) オゾン

処理水の変異原性が塩素処理水よりも弱い点で好ましいが、残留性がなく、単独での使用は適切ではない。

本研究ではさらに、消毒処理水の微生物的安全性に対する不活化力と残留性の役割についての定量的評価を可能にするため、消毒処理における反応のモデル化を行って、考察をすすめた。結果として表6.7を得ている。この検討によって、クロラミン処理水については、残留性には優れているが不活化力が弱い点で、またオゾン処理水については、残留性がない点で、それぞれ消毒処理水としては適さないと判断できた。また、塩素と二酸化塩素を比較すると、二酸化塩素が残留する領域では二酸化塩素処理水の方がより好ましい処理水といえるが、二酸化塩素の残留性が十分確保されないならば塩素を使わざるをえないことを指摘した。結局、残留性が確保されるように処理が行われれば、二酸化塩素は優れた消毒剤であるという、実験結果から得られた結論を支持した。

米国では、主としてトリハロメタン生成を抑制するために、塩素から他の消毒剤に変更した事業体はいくつかある。米国水道協会研究基金の調査では、塩素から他の消毒剤に変更した事業体のうち、72%はクロラミン、13%は二酸化塩素、8%はオゾン、7%は過マンガン酸カリウムを採用したと報告している⁵⁾。クロラミンの採用率が高いのは、手軽にトリハロメタン生成抑制ができるからであるが、浄水場内での不活化効果のモニタリング、給配水系統での微生物数のモニタリングが重要となろう。米国EPAも、クロラミンは浄水中の一般細菌数が少ない良好な水質のときに使用が可能であろうが、数年経過すると給配水系統での細菌数の増加が懸念されている¹⁷⁾。一方、塩素から二酸化塩素に一時的に消毒剤を変更し、給配水中の細菌数を調べたLouisville Water Companyの例¹⁷⁾がある。ここでは通常は塩素による消毒を行っているが、10日間だけ二酸化塩素に変更し、給配水中の細菌数の変化を調べた。その結果、標準平板で集落を形成する菌の1 ml中の平均個数は、二酸化塩素による消毒の前、中、後それぞれ約83, 65, 87であり、二酸化塩素処理期間中細菌数が僅かに減少したことを示していた。二酸化塩素の場合、残留性は塩素よりも劣るが残留すれば塩素よりも大きな不活化効果が発揮される点が特徴であるので、二酸化塩素を使用した場合には、残留濃度のモニタリングを確実に実行する必要があると考えられる。

二酸化塩素を使用する場合に留意すべきもうひとつの点は、無機副生成物による毒性である。本研究では、亜塩素酸イオン(ClO_2^-)による毒性を定性的に指摘するにとどまっているが、二酸化塩素処理水の有害性評価には、変異原性の他にこの無機副生成物による毒性を含める必要がある。米国EPAでは、 ClO_2^- 、 ClO_3^- 、 ClO_2 の残留量の合計を0.5mg/l以下に制限することを提唱している¹⁷⁾ことを受けて、小沢ら¹⁸⁾は、二酸化塩素処理の対象水の条件について検討を行っている。その結果、二酸化塩素は、TOCが1mg/l以下の原水に対して前塩素の代替として使用できる可能性があること、TOCが1mg/lを越える原水に対しては凝集沈殿処理によりTOCを1mg/l以下に削減した後、中間塩素処理の代替として、またはろ過処理後に後塩素処理の代替として使用できる可能性が高いと結論している。このように、二酸化塩素を採用する場合には、二酸化塩素の注入量、または処理の対象水が制約を受ける可能性があり、対象水ごとに調査を行い、無機副生成物による毒性が顕在化しないよう注意する必要がある。

第5節 結 語

本章では、まず消毒剤の残留性に関する実験を行った後、本研究で得られた実験結果を総合し、消毒処理水の安全性に関して考察した。

二酸化塩素は、不活化力が塩素よりも大きく、しかも処理水の染色体異常誘発性が塩素処理水よりも弱い点で、消毒剤としての優れた特性を備えている。したがって、残留性を確保しつつ使用するならば、処理水の微生物的安全性を十分確保しつつ、副生成物による有害性が低い飲料水を供給することが可能であり、二酸化塩素は優れた消毒剤であることを指摘した。第3節では、消毒剤の不活化力と残留性との関係を補うものとして消毒過程における反応をモデル化して考察を行った。その結果、残留性が確保されるように処理が行われれば、二酸化塩素は優れた消毒剤であるという、実験結果から得られた結論を支持した。

また、二酸化塩素を使用した場合、残留性は塩素よりも劣ると推察されたものの、残留していれば塩素よりも大きな不活化効果が発揮される点が特徴であるので、残留濃度のモニタリングを確実に実行する必要がある点を指摘した。

参考文献

- 1) Hoigne, J., Bader, H., Rate Constants of Reactions of Ozone with Organic and Inorganic Compounds in Water-I Non-dissociating Organic Compounds, Water Research, Vol. 17, pp. 173-183, 1983
- 2) 芦立德厚, 二酸化塩素の消毒特性と指標細菌に関する検討, 日本水道協会工務部、水道における二酸化塩素の適正使用方法に関する基礎的研究 平成3年度研究報告書, pp. 3-18, 1992
- 3) White, G. C., Handbook of Chlorination, Van Nostrand Reinhold Company, 1986
- 4) 佐藤雄典, クロラミン処理における消毒効果と副生成物に関する調査実験, 日本水道協会工務部、水道における二酸化塩素の適正使用方法に関する基礎的研究 平成3年度研究報告書, pp. 172-188, 1992
- 5) Lykins, B. W., Moser, R., DeMarco, J., Treatment Technology in The United States: Disinfection and Control of Disinfection By-products, The 2nd Japan-U. S. Governmental Conference on Drinking Water Quality Management, US-4, 1990
- 6) 金子光美, 水の消毒の動向, 用水と廃水, Vol. 32, No. 4, pp. 3-7, 1990
- 7) Lykins, B. W., Koffsky, W. E., and Miller, R. G., Chemical Products and Toxicologic Effects of Disinfection, Journal American Water Works Association, Vol. 78, No. 11, pp. 66-75, 1986
- 8) Subcommittee on Disinfectants and Disinfectant By-Products, Commission on Life Sciences, National Research Council : Drinking Water and Health, Disinfectants and Disinfectant By-Products, Vol. 7, 1987
- 9) Noot, D. K., Anderson, W. B., Daignault, S. A., Williams, D. T., and Huck, P. M., Evaluating Treatment Processes with The Ames Mutagenicity Assay, Journal American Water Works Association, Vol. 81, No. 9, pp. 87-102, 1989
- 10) McGuire, M. J., Krasner, S. W., The Nature and Occurrence of Disinfection By-products in The United States, The 2nd Japan-U. S. Governmental Conference on Drinking Water Quality Management, US-5, 1990
- 11) Manwaring, J. F., Clark, R. M., Research Needs in The U. S. Water Supply

- Industry With Respect to Disinfection By-Products, The 2nd Japan-U. S. Govenmental Conference on Drinking Water Quality Management, US-8, 1990
- 12) Regli, S., Means, E. G., and Lykins, B. W., Disinfection and Disinfection By-products Regulations in The United States, The 3rd U. S. -Japan Govenmental Conference on Drinking Water Quality Management, 1992
- 13) Magara, Y., Aizawa, T., and Takagi, H., Ozone and Chlorine Dioxide Byproducts and Its Behavior in Water Treatment System, The 2nd Japan-U. S. Govenmental Conference on Drinking Water Quality Management, J-5, 1990
- 14) Sasaki, T. and Ueda, S., Chloropicrin, ozonation/chlorination By-product: Its Formation and Precursor-control in Advanced Treatment Technology, The 3rd U. S. -Japan Govenmental Conference on Drinking Water Quality Management, 1992
- 15) Meier, J. R., Lingg, R. D., and Bull, R. J., Formation of Mutagens Following Chlorination of Humic Acid : A Model for Mutagen Formation during Drinking Water Treatment, Mutation Research, Vol. 118, pp. 25-41, 1983
- 16) Hemming, J., Holmbom, B., Reunanen, M., and Kornberg, L., Determination of the Strong Mutagen 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2-(5H)-furanone in Chlorinated Drinking and Humic Waters, Chemosphere, Vol. 15, pp. 549-556, 1986
- 17) 米国環境保護庁編，真柄泰基監訳，飲料水とトリハロメタン，1983
- 18) 小沢茂，相沢貴子，富沢恒夫，斉藤実，真柄泰基，二酸化塩素処理の反応生成物に関する検討，水道協会雑誌，第60巻第4号，pp. 10-18，1991

第7章 結 論

本研究は、塩素消毒の再考が求められている飲料水の消毒問題を取りあげ、塩素とその代替消毒剤の特性を、消毒処理水の安全性の面から比較したものである。消毒処理水の安全性としては、副生成物による有害性と、微生物的な安全性の両面を取りあげた。さらに、微生物的な安全性が達成されるための消毒剤の特性として、消毒剤の微生物に対する不活化力と消毒剤そのものの残留性の2つを取りあげた。すなわち本研究は、消毒処理水の安全性を以下の3つの特性、①消毒副生成物による有害性、②消毒剤の微生物に対する不活化力、③消毒剤そのものの残留性、によって評価することにより、塩素とその代替消毒剤の特性を比較し、塩素よりも優れた単一の消毒剤がありうるかについて検討することを目的とした。検討した消毒剤は、塩素、二酸化塩素、クロラミン、オゾンの4種類である。以下、本研究の成果を要約する。

本研究では、消毒処理水の有害性は、その変異原性によって調べた。変異原性試験として、哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験を行い、細胞としてはチャイニーズ・ハムスター肺細胞（CHL）を使用した。第3章で行う染色体異常試験に先立ち、第2章では、試験結果を客観的に定量化するために、画像解析を導入した。

特徴は、筆者の検鏡に依存していない点で、あらかじめ専門家が正常・異常の判断をした染色体異常アトラスを解析対象として識別方法を構築した。その結果、開発した識別方法の信頼度を高い客観性を有しつつ定量化することができた。染色体の形状解析のためにとりあげたパラメータは、周囲長、包絡周囲長、幅、絶対最大長、面積、穴の有無である。染色体の1本1本についてこれらのパラメータを測定し、それらを組み合わせることによって染色体形状を特徴づけ、異常染色体を識別することを試みた。その結果、交換型異常染色体に対しては、91.1%という識別率が得られ、実際標本の画像解析に本識別方法を適用しうるものと判断された。

また、実際に標準試料を投与したCHL細胞の染色体を画像解析した結果、MNNG、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒドについて、交換型異常染色体検出数の投与濃度に対する濃度依存性が示され、染色体異常誘発性が陽性

と判定した。一方、クロロホルム、ブチルアルデヒドについては、染色体異常誘発性は陰性と判定した。

第3章では、濃縮した琵琶湖水を4種の消毒剤を用いて処理し、その処理水の染色体異常誘発性について比較検討した。結果を要約すると、

- ①塩素処理水は低塩素消費域から染色体異常誘発性を有意に認め、4種のうちでは最も強かった。
- ②二酸化塩素処理水については、染色体異常誘発性は塩素処理水よりも弱く、最大でも塩素処理水の1/2程度であった。しかし、亜塩素酸イオン(ClO_2^-)が蓄積する結果細胞毒性が認められ、無機副生成物の監視は怠れないと考えられた。
- ③クロラミン処理水は、本実験における琵琶湖水の濃縮倍率、クロラミン消費量の範囲では染色体異常誘発性は認められなかった。
- ④オゾン処理水は、低消費量範囲では染色体異常誘発性は認められないが、高消費量範囲では塩素処理水を上回る点が特徴であり、消毒ではなく他の用途にオゾンを高注入率で使用する時注意が必要であると考えられた。

すなわち消毒処理水の染色体異常誘発性は、通常の消毒処理の範囲では、塩素処理水が最も強く、ついで二酸化塩素処理水、オゾン処理水の順であり、クロラミン処理水の染色体異常誘発性が最も弱いといえた。

⑤副生成物としてクロロホルムと $\text{C}_0 \sim \text{C}_3$ の直鎖低分子アルデヒドを測定し、各消毒処理水の染色体異常誘発性との関係について検討したところ、これらの副生成物はいずれも、消毒処理水の染色体異常誘発性にはほとんど寄与していないことが明らかとなった。

⑥特にpHを変化させて塩素処理を行った結果、塩素処理水の染色体異常誘発性とクロロホルム生成量とは逆傾向を示した。しかし塩素によって有機物が酸化された量と染色体異常誘発性とは対応していたことから、他の有機塩素化合物または他の酸化生成物の寄与が示唆された。

なお、染色体異常誘発性に対する消毒副生成物の寄与に関する詳しい検討は付録に掲載した。

第4章では、ウイルス汚染の指標として大腸菌ファージをとりあげ、各消毒剤の不活化力と不活化特性を実験的に検討した。まず第1節では、実験に使用した大腸菌ファージが腸管系ウイルスと同じ種類に群別できることを示した。第2節の実験結果から、各消毒剤の特性を塩素と比較すると、

- ①二酸化塩素については、(a)全pH範囲において塩素より不活化力が大きい、(b)有機物共存下においても塩素より不活化力が大きい、(c)アンモニア性窒素と反応しない、という利点がある一方、有機物とよりよく反応するので、対象水の二酸化塩素要求量をよく把握して注入量をコントロールすることが必要であると考えられた。
- ②クロラミンについては、(a)有機物との反応性が低いので消毒剤消費量が少なく、注入量のコントロールがしやすい、(b)アンモニア性窒素と反応しない、という利点がある一方、不活化力が小さいので短時間での不活化効果は期待できない欠点があった。
- ③オゾンについては、アンモニア性窒素の影響が僅かであるという利点がある一方、有機物とよりよく反応するので、不活化効果が塩素よりも低下する場合があるという欠点があった。

琵琶湖水中有機物共存下での不活化実験によれば、消毒力ひいては酸化力が強いもののほど有機物ともよく反応し、その結果、大腸菌ファージの不活化効果が緩衝液中に比べて大きく低下する傾向にあった。この結果、有機物共存下での大腸菌ファージの不活化効果は、二酸化塩素が最も強く、ついで塩素、オゾン、クロラミンの順となった。

第5章では、消毒処理過程において一旦ダメージを受けた菌に着目し、その挙動を実験的に調べた。得られた結果を要約すると、

- ①一旦塩素によってダメージを受けた *E. coli* が、砂ろ過水中で回復、再増殖することを示し、給水過程で残留塩素がなくなれば、実際に回復と再増殖がおきうることを指摘した。
- ②水中のSS濃度が高まると回復と再増殖はより速やかにおこること、オゾン処理水、活性炭処理水といった高度処理水中でも回復と再増殖はやはりおきうることを示した。

③各消毒処理によって回復の可能性のある菌がいかに生成するかを調べた結果、消毒が不完全な場合には、回復可能な菌の割合が増大する可能性があるものの、実際処理の範囲では、回復可能菌のみが残存することは考えにくいことを示した。

第6章では、まず消毒剤の残留性に関する実験を行った後、本研究で得られた実験結果を総合して消毒処理水の安全性に関して考察した。

琵琶湖水中有機物が存在する水中で残留性を調べたところ、残留性の点で最も優れているのはクロラミンであり、ついで塩素が優れている。二酸化塩素は塩素よりは残留性に劣っており、オゾンの残留性はないといえた。

つぎに本研究で得られた結果を総合したところ、二酸化塩素は、不活化力が塩素よりも大きく、しかも処理水の染色体異常誘発性が塩素処理水よりも弱い点で、消毒剤としての優れた特性を備えているといえた。したがって、残留性を確保しつつ使用すれば、処理水の微生物的安全性を十分確保しつつ、副生成物による有害性が低い飲料水を供給することが可能であり、二酸化塩素が優れた消毒剤であることを指摘した。

また、消毒剤の不活化力と残留性との関係を補うものとして、消毒過程における反応をモデル化して考察を行った。その結果、実験結果から考察した上記の結論を支持した。

二酸化塩素を使用する場合に留意すべきこととして、二酸化塩素の場合、残留性は塩素よりも劣ると推察されたものの、残留していれば大きな不活化効果が発揮される点の特徴であるので、二酸化塩素の残留濃度のモニタリングを強化する必要がある点を指摘した。さらに、すでに指摘され、第3章でもその毒性が確認された、無機副生成物(ClO_2^- , ClO_3^-)のモニタリングも必要である。

本研究は、消毒処理水の安全性を以下の3つの特性、①消毒副生成物の有害性、②消毒剤の微生物に対する不活化力、③消毒剤そのものの残留性、によって評価することを目的としたものであり、上記結論を得たことによって一通りの目的を達した。しかし本研究で積み残された課題も多い。

本研究では、上水に使用する単一の消毒剤としては二酸化塩素が優れていることを指摘したが、消毒のあり方の検討は本来、上水処理システムの将来像と対応させて行う必要がある。それは、上水処理の方法、規模、地域性、水の用途などによっ

て、適した消毒のあり方（消毒剤の組合せを含む）も変わってくると予想されるからである。そこでは当然、コスト、臭味、操作性なども検討の対象となる。本研究ではこれらの点を課題としてとりあげるには至らなかったが、実用に供するために必要な課題である。

一方、最大の課題は、消毒処理水の微生物的な危険性と副生成物による有害性の双方を同時に評価する方法論を具体化することであると考ええる。本研究では、微生物による危険性と副生成物による有害性とを別々に考え、いわば同列に扱っている。しかし、微生物による感染というリスクと副生成物による発癌というリスクとを同列に扱うことは本来できないものと考えられる。例えばこれらを死亡率などに換算し足し算することもひとつの方法と考えられよう。精度の問題など種々の困難が容易に予想できるが、この課題は飲料水や環境水のリスクを、我々をとりまく他のリスクとを比較して論ずることを可能にすることから、工学的な具体化が是非望まれる。

付録 染色体異常誘発性に対する消毒副生成物の寄与に関する考察

第1節 目的

消毒処理水の有害性を比較するためには、本研究の染色体異常試験のようなバイオアッセイを行うことが最も望ましい。それは、種類のみならず化学物質としての特性もが多様である副生成物に対し、バイオアッセイはそれらの総括的水質指標とみなせるからである。それに対し、消毒副生成物を分析することによって、処理水の有害性を推定しようとする手法がある。しかし本研究のように、異なる消毒剤で処理した処理水を対象とする場合、ある消毒処理副生成物を分析してその有害性を比較することは大変注意深く行わなければならない。それは、各消毒剤はそれぞれ有機物との反応性が少しずつ異なるからである。例えば、二酸化塩素やクロラミンを用いれば、生成するトリハロメタンやTOX(全有機ハロゲン化合物)は塩素の場合よりも少なくなるが、新たな生成物によって新たな有害性が生起する可能性を否定できない。オゾン処理によつてはトリハロメタンやTOXは生成しないが、オゾン処理水の染色体異常誘発性が塩素処理水を上回る場合がありうることを第3章で示した。このような、反応性の異なる消毒剤によって処理された消毒処理水に対し、副生成物を分析することによってその有害性を比較するためには、いかなる物質に着目すればよいのか。本研究付録では、このような観点から、消毒処理水の染色体異常誘発性に対する副生成物の寄与に関して検討を行う。

ところで第3章では、消毒副生成物のうちクロロホルムと $C_0 \sim C_3$ の直鎖低分子アルデヒドを測定して、消毒処理水の染色体異常誘発性に対する寄与度を検討したが、これらの物質がほとんど寄与していないことがわかった。そこでここでは、個々の化合物ではなく、官能基を中心とする原子団に着目して検討していくことにする。実験的検討に先立って、第2節では、今までに報告されている染色体異常試験データを解析することにより、いかなる分子構造が染色体異常を誘発しやすいかを調べる。ついで第3節では、この解析で指摘された構造を有する物質が、塩素とその代替消毒剤によっていかに生成するかを調べ、染色体異常誘発性との関係を実験的に検討する。

第2節 分子構造と染色体異常誘発性との関係の解析

2. 1 解析対象データ

国立衛生試験所から報告されている染色体異常試験データ¹⁾を中心とする。このデータは、すべてチャイニーズ・ハムスター肺細胞（CHL）を用い、同一の試験手順によって実施された結果である。培養3日目のCHL細胞に各濃度の検体を加え、24時間後または48時間後に染色体標本を作製、100個の中期分裂像を観察して、異常染色体数をその種類ごとに計数してある。種々の異常のうち、発癌物質は、交換型異常を多く誘発する傾向にあるとされることから、検体の一定濃度あたりの交換型異常をもつ細胞の出現頻度（TR値）を試験結果の定量的比較方法のひとつとして提示されている。そこで本データからつぎの値を算出した。

$$TR = \frac{E}{D} \quad (1)$$

ここに、Eは100個の細胞中染色分体交換をもつ細胞数、Dはそのときの処理濃度（mg/ml）である。検体各濃度についてこの値を算出し、その最大値をその化合物のTR値として採用した。ただし、本研究の試験条件と同一とするため、検体を添加後24時間後に作製した染色体標本のデータのみをとりあげ、また代謝活性化したものも除外した。付表1に解析対象とした化合物の諸元、付表2にTR値を示す。付表2に併記したD20値及びTR(g)値は、直接法の24及び48時間処理、また代謝活性化条件下のデータすべてを対象にしたときの値である。ここにD20値とは、観察細胞の20%に何らかの異常がみられる濃度（mg/ml）を意味する。解析には新たに計算して求めたTR(cle)値を使用した。染色体異常試験データのうち、無機物や分子式の特定が困難な化合物は除外することにし、解析対象化合物数は465であった。

2. 2 解析方法の概要

対象化合物の原子結合表を作成し、構成原子団及び構成原子を2つの方法で分類した。まず、方法1の分類は、官能基を念頭においたものであり、対象化合物を付表3に示す構成原子団に分解し、各構成原子団保有数を説明変数として、TR値を説

付表1 解析対象化合物一覧

CAS-No:ケミカルデータベース登録番号, Molweight:分子量, formula:分子式

No-C	化合物名	CAS-No	Molweight	formula
002	Acetaldehyde	75070	44.053	C02H04O01
003	Acetanilide	103844	135.165	C08H09N01O01
004	Acetohexamide	968810	318.351	C15H14N02O04S01
005	Acetone	67641	58.079	C03H06O01
006	Acetophenone	98862	120.150	C08H08O01
007	2-Acetylaminofluorene	53963	223.273	C15H13N01O01
008	1-Acetyl-1-methyl-2-nitroso-2-phenylhydr	—	193.204	C09H11N03O02
009	1-Acetyl-1-methyl-2-phenylhydrazine	—	164.206	C09H12N02O01
010	Acetylsalicylic acid	—	180.158	C09H08O04
011	Acridine	260946	179.221	C13H09N01
012	Acrylamide	79061	71.078	C03H05N01O01
013	Acrylic acid	79107	72.063	C03H04O02
014	Acrylonitrile	107131	53.063	C03H03N01
017	dl-Alanine	302727	89.093	C03H07N01O02
021	Allyl Caproate	123682	156.223	C09H16O02
023	Ametryne	834128	227.333	C09H17N05S01
024	9-Aminoacridine Hydrochloride	134509	194.235	C13H09N02
026	2-Amino-9h-pyrido- [2, 3, -b] indole acetate	—	183.212	C11H09N03
028	2-Amino-3-methyl-9h-pyrido- [2, 3, -b] indol	—	197.239	C12H11N03
029	2-Amino-4-nitrophenol	99570	154.124	C06H06N02O03
030	2-Amino-5-nitrophenol	121880	154.124	C06H06N02O03
032	Ammonium bicarbonate	1066337	76.030	C01H02N01O03
037	dl-Amphetamine sulfate	60139	135.208	C09H13N01
039	n-Amyl-n'-nitroguanidine	35089691	174.201	C06H14N04O02
040	n-Amyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	13010101	203.199	C06H13N05O03
041	n-Amyl-n-nitrosourea	10589749	159.187	C06H13N03O02
042	n-Amyl-n-nitrosourethane	64005625	188.225	C08H16N02O03
043	n-Amylurea	38869919	130.189	C06H14N02O01
044	Amylurethane	7451469	159.227	C08H17N01O02
045	Aniline	62533	93.128	C06H07N01
046	Aniline hydrochloride	142041	93.128	C06H07N01
047	p-Anisaldehyde	123115	136.149	C08H08O02
048	p-Anisidine	104949	123.154	C07H09N01O01
051	Antracene	120127	178.233	C14H10
055	l-Ascorbic acid	50817	176.123	C06H08O06
056	l-Ascorbyl stearate	25395668	442.589	C24H42O07
057	l-Aspartic acid	56848	133.102	C04H07N01O04
058	Aspirin anhydride	—	342.302	C18H14O07
059	Atrazine	1912249	215.685	C08H14N05C101
061	Barbital	57443	184.193	C08H12N02O03
065	Benzaldehyde	100527	106.123	C07H06O01
066	Benzene	71432	78.113	C06H06
067	a-BHC	319846	290.831	C06H06C106
068	gamma-BHC	58899	290.831	C06H06C106
069	Benzo (a) pyrene	50328	252.315	C20H12
070	Benzole acid	65850	122.122	C07H06O02
071	Benzoin	119539	212.247	C14H12O02
072	Benzoyl peroxide	94360	242.229	C14H10O04
075	Benzyl alcohol	100516	108.139	C07H08O01
076	n-Benzyl-n- (benzoylaminoethyl) nitrosamine	59665064	269.302	C15H15N03O02
077	Benzyl cyanide	140294	117.150	C08H07N01
078	s-Benzyl-diisopropyl-phosphorothioate	26087478	288.346	C13H21O03P01S01
079	n-Benzyl-n- (propionylaminomethyl) nitros	—	221.258	C11H15N03O02
080	Bis (2-bromo-2-propenyl) hydrogen phosphat	—	335.915	C06H09O04P01Br02
081	1, 3-Bis (2-chloroethyl) -1-nitrosourea	154938	214.050	C05H09N03O02C102
083	Bis (dimethylthiocarbamoyl) disulfide	137268	240.438	C06H12N02S04

(付表1 続き)

087	Bromodichloromethane	75274	163.829	C01H01Cl02Br01
088	Alphabromo-iso-butylic-acid	2052019	167.001	C04H07O02Br01
089	1- (4'-Bromophenylazo) benzyl hydroperoxid	—	307.145	C13H11N02O02Br01
090	Alpha-bromopropionic acid	598721	152.975	C03H05O02Br01
091	Buformin	692137	157.218	C06H15N06
092	Buformylhydrochloride	15537732	157.218	C06H15N06
093	Busulfan	55981	246.303	C06H14O06S02
095	Butyl acetate	123864	116.159	C06H12O02
096	n-Butyl-n- (acetoxymethyl) nitrosamine	56986357	216.278	C10H21N02O03
097	n-sec-Butyl-n- (acetoxymethyl) nitrosamin	56986379	174.198	C07H14N02O03
098	n-Butyl-n- (acetylaminoethyl) nitrosamin	64005589	173.214	C07H15N03O02
099	Butylated hydroxyanisole	25013165	180.245	C11H16O02
100	Butylated hydroxytoluene	128370	220.354	C15H24O01
101	Butylbutanolamine	4543957	145.244	C08H19N01O01
102	Butylbutanol nitrosamine	3817116	174.242	C08H18N02O02
103	n-Butyl-n- (3-carboxypropyl) nitrosamine	38252743	188.225	C08H16N02O03
104	n-Butyl-n- (methoxymethyl) nitrosamine	64005614	146.188	C06H14N02O02
105	n-sec-Butyl-n- (methoxymethyl) nitrosamine	64005636	146.188	C06H14N02O02
106	n-Butyl-n'-nitroguanidine	5458833	160.175	C05H12N04O02
107	n-Butyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	13010087	189.172	C05H11N05O03
108	n-Butyl nitrosourea	869012	145.160	C05H11N03O02
109	n-Butyl-n-nitrosourethane	6558787	174.198	C07H14N02O03
110	Butylphthalylbutylglycolate	85701	352.381	C18H24O07
111	n-Butyl p-hydroxybenzoate	94268	195.229	C11H14O03
112	Butylurea	592314	116.162	C05H12N02O01
113	Butylurethane	591628	145.200	C07H15N01O02
114	Butyric acid	107926	88.106	C04H08O02
120	Caffeine	58082	194.192	C08H10N04O02
134	d-Camphor	464493	152.235	C10H16O01
135	Caprolactam	105602	115.159	C06H11N01O01
136	Epsilon caprolactone	502443	114.143	C06H10O02
139	Captafol	2425061	349.064	C10H09N01O02S01C104
147	Carbon tetrachloride	56235	153.823	C01H00Cl04
161	m-Chloroaniline	108429	127.573	C06H06N01Cl01
162	o-Chloroaniline	95512	127.573	C06H06N01Cl01
163	p-Chloroaniline	106478	127.573	C06H06N01Cl01
164	Chlorobenzene	108907	112.558	C06H05Cl01
166	Chlorpromazine hydrochloride	69090	318.870	C17H19N02S01C101
167	Chlorpropamide	94202	276.742	C10H13N02O03S01C101
168	Chlorpyrifos	2921882	350.589	C09H11N01O03P01S01C103
171	Cinnamic aldehyde	104552	132.161	C09H08O01
172	Cinnamyl anthranilate	87296	253.299	C16H15N01O02
173	Citral	5392405	152.235	C10H16O01
174	Citric acid	77929	192.122	C06H08O07
176	Clofibrate	637070	242.701	C12H15O03C:01
177	Clofibrate acid	882097	214.647	C10H11O03C101
178	Cocaine hydrochloride	53214	289.329	C16H19N01O04
183	Creatinine	60275	113.118	C04H07N03O01
184	Curcumin	458377	368.383	C21H20O06
187	Cyclohexane (CYHA)	—	84.161	C06H12
188	Cyclohexylamine	108918	99.175	C06H13N01
189	Cyclophosphamide	50180	245.088	C07H15N02O01P01C102
192	Cytosine arabinoside	147944	243.217	C09H13N03O05
195	Dehydroacetic acid	520456	168.147	C08H08O04
196	2, 4-Diaminoanisole sulfate	39156417	138.168	C07H10N02O01
197	1, 4-Diaminoanthraquinone	128950	238.244	C14H10N02O02
198	3, 5-Diaminobenzoic acid	535875	152.152	C07H08N02O02
200	Diazinon	333415	304.348	C12H21N02O03P01S01
204	Dibenzofuran	132649	168.194	C12H08O01

(付表 1 続き)

205	Dibenzoylhydramine	—	490.580	C26H26N4O4S01
207	Dibromochloromethane	124481	208.280	C01H01Cl01Br02
208	2,3-Dibromo-1-propanol	96139	217.887	C03H06O01Br02
209	2,3-Dibromopropyl dihydrogen phosphate	—	297.866	C03H07O04P01Br02
210	n-Dibutylamine	111922	129.245	C08H19N01
211	n-Nitrosodl-n-butylamine	924163	158.243	C08H18N02O01
212	n, n'-Dibutyl-n-nitrosourea	56654525	201.267	C09H19N03O02
213	n, n'-Dibutylurea	1792172	172.269	C09H20N02O01
214	1,4-Dichlorobenzene	106467	147.004	C06H04Cl02
215	1,1-Dichloroethane	75343	98.960	C02H04Cl02
216	1,2-Dichloroethane	107062	98.960	C02H04Cl02
217	cis-1,2-Dichloroethylene	156592	96.944	C02H02Cl02
218	1,1-Dichloroethylene	75354	96.944	C02H02Cl02
219	Methylenechloride	75092	84.933	C01H02Cl02
220	2,3-Dichloro-1-propanol	616239	128.985	C03H06O01Cl02
221	1,3-Dichloropropene	542756	110.971	C03H04Cl02
222	2,2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate	62737	220.975	C04H07O04P01Cl02
223	Dicofol	115322	370.489	C14H09O01Cl05
224	Diethanolnitrosamine	1116547	134.133	C04H10N02O03
225	Diethylene glycol	111466	106.120	C04H10O03
226	n-Nitrosodiethylamine	55185	102.135	C04H10N02O01
227	Diethyl phthalate	84662	222.239	C12H14O04
228	n, n'-Diethyl-p-phenylenediamine	93050	164.250	C10H16N02
229	Diethylstilbestrol	56531	268.354	C18H20O02
232	2,5-Dihydroxybiphenyl	1079216	186.209	C12H10O02
233	Diketobutyl-1-phenyl-2-methyl-2-nitros	—	249.224	C11H11N03O04
234	Dimethoate	60515	229.260	C05H12N01O03P01S02
235	4,4'-Dimethoxydiphenylamine	101702	229.277	C14H15N01O02
236	2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine hydrochloride	15589001	209.287	C12H19N01O02
237	4-Dimethylaminopyrrolidine	58151	231.296	C13H17N03O01
238	1,12-Dimethylbenz(a)anthracene	57976	256.346	C20H16
239	1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride	306376	60.099	C02H08N02
240	n-Nitrosodimethylamine	62759	74.082	C02H06N02O01
241	3,4-Dimethylphenyl n-methylcarbamate	2425107	179.217	C10H13N01O02
242	3,4-Dimethylphenyl n-nitroso-n-methylcarbamate	5819336	208.215	C10H12N02O03
243	n, n'-Dimethyl-p-phenylenediamine	99989	136.196	C08H12N02
244	Dimethyl terephthalate	120616	194.185	C10H10O04
245	n, n'-Dimethyl-1-tryptamine	61507	188.272	C12H16N02
246	n, n'-di-Naphthyl-p-phenylenediamine	93469	360.457	C26H20N02
247	2,4-Dinitrochlorobenzene	97007	202.552	C06H03N02O04Cl01
248	1,3-Dinitropropene	75321209	292.249	C16H08N02O04
249	1,6-Dinitropropene	42397648	292.249	C16H08N02O04
250	1,8-Dinitropropene	42397659	292.249	C16H08N02O04
252	Dinitrosodimethylamine	—	271.302	C08H13N07O02S01
253	2,4-Dinitrotoluene	121142	182.134	C07H06N02O04
254	4,4-Diethylidiphenylamine	101677	393.654	C28H43N01
255	Diphenyl	92524	154.211	C12H10
256	4,4'-Diphenylmethane diisocyanate	101688	250.255	C15H10N02O02
257	N-Nitrosodipropylamine	621647	130.189	C06H14N02O01
258	n, n'-di-sec-Butyl-p-phenylenediamine	101962	220.357	C14H24N02
259	1-Ephedrine hydrochloride	50986	165.234	C10H15N01O01
267	Epichlorohydrin	106898	92.524	C03H05O01Cl01
269	Erythorbic acid	89566	176.123	C06H08O06
271	Ethenzamine	938738	165.191	C09H11N01O02
274	Ethionamide	536334	166.246	C08H10N02S01
275	di-Ethionine	67210	163.239	C06H13N01O02S01
276	Ethyl acetate	141786	88.105	C04H08O02
277	Ethyl acetoacetate	141979	130.142	C06H10O03
278	Ethyl acrylate	140885	100.116	C05H08O02

(付表 1 続き)

279	p-Ethylaniline	589162	121.182	C08H11N01
280	Ethylbenzene	100414	106.167	C08H10
281	n-Ethyl-n-(benzoylaminoethyl) nitrosamine	—	207.231	C10H13N03O02
282	Ethyl butyrate	105544	116.159	C06H12O02
283	Ethyl caproate	123660	144.212	C08H16O02
284	Ethyl caprylate	106321	172.266	C10H20O02
285	n-Ethyl-n-(3-carboxypropyl) nitrosamine	54897631	160.171	C06H12N02O03
286	Ethyl cinnamate	103366	176.214	C11H12O02
287	1,1'-Ethylene-bis (1-nitrosourea)	—	204.143	C04H08N06O04
288	EDTA	60004	292.242	C10H16N02O08
290	Ethylene glycol	107211	62.067	C02H06O02
291	n-Ethyl-n-(4-hydroxybutyl) nitrosamine	54897620	146.188	C06H14N02O02
292	Ethyl isovalerate	108645	130.186	C07H14O02
293	Ethyl methanesul(onate)	62500	124.159	C03H08O03S01
294	Ethyl n-ethylcarbamate	623789	117.147	C05H11N01O02
295	n-Ethyl-n'-nitroguanidine	39197621	132.121	C03H08N04O02
296	Ethyl n-ethyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	63885234	161.119	C03H07N05O03
297	n-Ethyl-n-nitrosourea	759397	117.106	C03H07N03O02
298	n-Ethyl-n-nitrosourethane	614959	146.144	C05H10N02O03
299	Ethyl n-methylcarbamate	105408	103.120	C04H09N01O02
300	Ethyl phenylacetate	101973	164.203	C10H12O02
301	Ethyl hydroxybenzoate	120478	166.175	C09H10O03
302	Ethyl propionate	105373	102.132	C05H10O02
303	n-Ethylurea	625525	88.109	C03H08N02O01
304	Ethyl vanillin	121324	166.175	C09H10O03
305	Eugenol	97530	164.203	C10H12O02
307	Famotidine	76824356	337.449	C08H15N07O02S03
308	Fenitrothion	122145	227.236	C09H12N01O05P01S01
320	5-Fluorouracil	51218	130.077	C4H03N02O02F01
321	Folic acid	59303	441.400	C19H19N07O06
323	Food blue no. 2	860220	466.356	C16H08N02O08Na02S02
326	Food red no. 2	915673	604.478	C20H11N02O10Na03S03
329	Food red no. 102	2611827	604.478	C20H11N02O10Na03S03
333	Food yellow no. 4	1934210	534.367	C16H09N04O09Na03S02
335	Formaldehyde	50000	30.026	C01H02O01
337	Fumaric acid	110178	116.072	C04H04O04
338	Furosemide	54319	330.746	C12H11N02O05S01Cl01
339	Furylfuramide	3688537	248.193	C11H08N02O05
345	Geosmin	19700211	182.305	C12H22O01
346	Geraniol	106241	154.251	C10H18O01
348	Acetic acid	64197	60.052	C02H04O02
349	Glibenclamide	10238218	494.008	C23H28N03O05S01Cl01
351	Gluconic acid solution	529964	196.154	C06H12O07
352	Glucono delta lactone	90802	178.139	C06H10O06
353	L-Glutamic acid	56860	147.129	C05H09N01O04
354	Glybusole	1492020	297.401	C12H15N03O02S02
355	Glycerin	56815	92.093	C03H08O03
357	Glycidyl phenyl ether	122601	150.176	C09H10O02
360	Glycylpyramide	631276	303.768	C11H14N03O03S01Cl01
361	Glycocyamine	352976	117.106	C03H07N03O02
362	Glycodiazine	339446	309.344	C13H15N03O04S01
363	Glycol-ether diamine tetraacetic acid	67425	380.347	C14H24N02O10
368	Guanidine carbonate	3425089	59.071	C01H05N03
372	Haloperidol	52868	375.869	C21H23N01O02F01Cl01
373	Heptachlor	76448	373.320	C10H05Cl07
376	Hexachlorobenzene	118741	284.784	C06H00Cl06
379	Hexane	—	86.177	C06H14
383	Hydantoic acid	—	118.091	C03H06N02O03
384	Hrdalazine hydrochloride	304201	160.178	C08H08N04

(付表 1 続き)

388	Hydrogen peroxide	7722841	34. 014	C00H02002
389	4-Hydroxyacetanilide	103902	151. 164	C08H09N01002
390	3-Hydroxyanthranilic acid	548936	153. 136	C07H07N01003
391	1,3-Hydroxy-kynurenine	606144	224. 214	C10H12N02004
392	n-Hydroxymethyl dimethyl phosphonopropic	—	226. 167	C06H15N02005P01
394	Indomethacin	53861	357. 791	C19H16N01004C101
403	Isoamyl acetate	123922	130. 186	C07H14002
404	Isoamyl butyrate	106274	158. 239	C09H18002
405	Isoamyl formate	110452	116. 159	C06H12002
406	Isoamyl isovalerate	659701	172. 266	C10H20002
407	Isoamyl propionate	105680	144. 212	C08H16002
408	n-Isobutyl-n-(benzoylaminoethyl)nitrosamine	54005590	235. 284	C12H17N03002
409	n-Isobutyl-n'-nitrosoguanidine	35089668	160. 175	C05H12N04002
410	n-Isobutyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	5461858	189. 172	C05H11N05003
411	n-Isobutyl-n-nitrosourea	760601	145. 160	C05H11N03002
412	n-Isobutyl-n-nitrosourethane	33124253	174. 198	C07H14N02003
413	Isobutyl p-hydroxybenzoate	4247023	194. 229	C11H14003
414	Isobutylurea	592176	116. 162	C05H12N02001
415	n-Isobutyl urethane	539899	145. 200	C07H15N01002
416	l-Isoleucine	73325	131. 173	C06H13N01002
417	Isoniazid	54853	137. 140	C06H07N03001
418	p-Isopropoxydiphenylamine	101735	227. 305	C15H17N01001
419	Isopropyl p-hydroxybenzoate	—	180. 202	C10H12003
423	Kojic acid	501304	142. 109	C06H06004
424	l-Kynurenine sulfate	—	208. 215	C10H12N02003
425	Lacchalic acid	60687936	537. 430	C26H19N01012
426	Lactic acid	50215	90. 077	C03H06003
429	Levodopa	59927	197. 189	C09H11N01004
430	Linalool synthetic	78706	154. 251	C10H18001
435	l-Lysine monohydrochloride	657272	146. 188	C06H14N02002
442	Malathion	121755	330. 360	C10H19O06P01S02
443	Maleic anhydride	108316	98. 057	C04H02003
444	dl-Malic acid	6915157	134. 086	C04H06005
445	Maltol	118718	126. 110	C06H06003
446	Mecamylamine hydrochloride	826391	167. 294	C11H21N01
447	d-(-)-Mannitol	69658	182. 171	C06H14006
449	Mefenamic acid	61687	241. 288	C15H16N01002
450	Menthyl	—	156. 267	C10H20001
452	6-Mercaptopurine	50442	152. 179	C05H04N04S01
453	Nescaline sulfate	5967420	211. 259	C11H17N01003
454	Mefenamic acid	15537721	129. 164	C04H11N05
455	Methamphetamine hydrochloride	826108	149. 235	C10H15N01
456	Methoxychlor	72435	345. 651	C16H15O02C103
458	n-Methyl-n-(acetylaminomethyl)nitrosamine	59665111	131. 133	C04H09N03002
459	n-Methyl-n'-acetyl-nitrosourea	28895912	145. 116	C04H07N03003
460	Methyl acetylricinolate	140034	354. 527	C21H38O04
461	n-Methyl-n'-acetylurea	623596	116. 119	C04H08N02002
462	Methyl acrylate	96333	86. 089	C04H06002
463	4-Methylaminoanthipyrine	—	217. 270	C12H15N03001
464	Methylasoxymethanol acetate	592621	132. 118	C04H08N02003
465	Methyl benzoate	98583	136. 149	C08H08002
468	2-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	54886	239. 319	C15H17N03
469	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	55801	239. 319	C15H17N03
470	alpha-Methylidopa	555306	211. 215	C10H13N01004
471	4,4-Methylene-bis(2-chloroaniline)	101144	267. 157	C13H12N02C102
472	dl-Methylephedrine hydrochloride	942461	179. 261	C11H17N01001
473	n-Methylguanidine	471294	73. 097	C02H07N03
475	2-NIB exo	2371428	168. 278	C11H20001
476	Methyl methanesulfonate	66273	110. 132	C02H06O03S01

(付表 1 続き)

477	n-Methyl-n'-nitrosoguanidine	4245765	118. 094	C02H06N04002
478	n-Methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	70257	147. 092	C02H05N05003
479	4-(n-Methyl-n-nitroso)aminoanthipyrine	—	246. 267	C12H14N04002
480	n-Methyl-n-nitroso-methyl anthranilate	—	194. 188	C09H10N02003
481	n-Methyl-n-nitrosourea	684935	103. 080	C02H05N03002
482	n-Methyl-n-nitrosourethane	613592	132. 118	C04H08N02003
483	Methyl n-methylanthranilate	85916	165. 191	C09H11N01002
484	3-Methylphenyl n-methylcarbamate	1129415	165. 191	C09H11N01002
485	3-Methylphenyl n-nitroso n-methylcarbamate	—	194. 188	C09H10N02003
486	Methyl p-hydroxybenzoate	99763	152. 148	C08H08003
487	7-Methylquinoline	612612	143. 188	C10H09N01
488	8-Methylquinoline	611325	143. 188	C10H09N01
489	Methyl salicylate	119368	152. 148	C08H08003
491	Methylurea	598505	74. 082	C02H06N02001
493	Milofin	24019054	544. 172	C19H11N02005Na01S01C104
495	Mononitrosoametryne	—	256. 331	C09H16N06001S01
496	Mononitrososulmetryne	—	242. 304	C08H14N06001S01
497	Monosodium fumarate	—	138. 054	C04H03O04Na01
501	Musk xylol	81152	297. 265	C12H15N03006
502	Naphthalene	91203	128. 173	C10H08
503	alpha-Naphthoquinoline	230273	179. 221	C13H09N01
504	beta-Naphthoquinoline	85029	179. 221	C13H09N01
505	alpha-Naphthylamine	134327	143. 188	C10H09N01
506	Naphthyl n-methylcarbamate	63252	201. 224	C12H11N01002
507	Naphthyl n-nitroso-n-methylcarbamate	7090257	230. 221	C12H10N02003
511	Nicotinamide	98920	122. 126	C06H06N02001
512	Nicotine	54115	162. 234	C10H14N02
513	Nicotinic acid	59676	123. 110	C06H05N01002
514	Nitrobenzene	98953	123. 110	C06H05N01002
515	2-Nitrofluorene	607578	211. 219	C13H09N01002
516	Nitrofurantoin	67209	238. 157	C08H06N04005
517	Nitrofurazone	59870	198. 136	C06H06N04004
519	Nitrosoguanidine	556887	104. 067	C01H04N04002
520	4-Nitro-o-phenylenediamine	99569	153. 139	C06H07N03002
521	2-Nitro-p-phenylenediamine	5307142	153. 139	C06H07N03002
522	1-Nitropyrene	5522430	247. 252	C16H09N01002
523	6-Nitroquinoline	613503	174. 158	C09H06N02002
525	Nitrosotriazine	—	244. 683	C08H13N06001C101
526	n-Nitrosodiphenylamine	86306	198. 223	C12H10N02001
527	Nitrosodihydroxy acid	60391926	147. 089	C03H05N03004
528	Nitrosoprometryne	—	270. 357	C10H18N06001S01
529	Nitrososilmaxine	—	230. 656	C07H11N06001C101
530	m-Nitrotoluene	99081	137. 137	C07H07N01002
531	o-Nitrotoluene	88722	137. 137	C07H07N01002
532	p-Nitrotoluene	99990	137. 137	C07H07N01002
534	Nylidrin hydrochloride	849558	299. 411	C19H25N01002
536	Oxalic acid	144627	90. 034	C02H02004
540	Paraverine hydrochloride	61256	339. 389	C20H21N01004
543	Pentachlorophenol	87865	266. 338	C06H01C105
547	Perillaldehyde	2111753	150. 220	C10H14001
550	Phenacetin	62442	179. 217	C10H13N01002
551	Phenanthrene	85018	178. 233	C14H10
552	Phencyclidine hydrochloride	956901	243. 391	C17H25N01
553	Phenobarbital	50066	232. 237	C12H12N02003
554	Phenobarbital sodium	57307	254. 219	C12H11N02003Na01
555	Phentolamine	50602	281. 356	C17H19N03001
556	l-Phenylalanine	63912	165. 191	C09H11N01002
557	2-Phenyl-1,4-benzoquinone	363031	184. 193	C12H08002
559	Phenylbutazone	50339	308. 378	C19H20N02002

(付表 1 続き)

560	m-Phenylenediamine	108452	108.143	C06H08N02
561	o-Phenylenediamine	95545	108.143	C06H08N02
562	p-Phenylenediamine	106503	108.143	C06H08N02
563	n-Phenyl-1-naphthylamine	90302	219.285	C16H13N01
564	o-Phenylphenol	90437	170.210	C12H10O01
565	o-Phenylphenol sodium salt	132274	192.192	C12H09O01Na01
568	n-Butyl phthalate	84742	278.346	C16H22O04
570	Phytic acid	83683	660.028	C06H18O24P06
571	Piperonyl butoxide	51036	338.441	C19H30O05
589	Prometryne	7287196	241.360	C1019N05S01
591	Propazine	139402	229.712	C09H16N05Cl01
592	beta-Propiolactone	57578	72.063	C03H04O02
593	Propylene glycol	—	76.094	C03H08O02
596	Propyl gallate	121799	212.200	C18H22O05
597	n-Propyl-n'-nitroguanidine	35091646	146.148	C04H10N04O02
598	n-Propyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	13010076	175.146	C04H09N06O03
599	n-Propyl-n-nitrosourea	846579	131.133	C04H09N03O02
600	n-Propyl-n-nitrosourethane	19935865	160.171	C06H12N02O03
610	Propylurea	627065	102.135	C04H10N02O01
602	Propylurethane	623858	131.173	C06H13N01O02
606	Pterosin a	35910163	248.320	C15H20O03
607	Pterosin b	34175967	218.294	C14H18O02
608	Pterosin c	—	234.293	C14H18O03
609	Pterosin f	34175989	236.740	C14H17O01Cl01
610	Pterosin i	41411045	264.319	C15H20O04
613	Pyrene	129000	202.255	C16H10
616	Prydine	110861	79.101	C05H05N01
617	Pyridoxine hydrochloride	58560	169.179	C08H11N01O03
619	Quercetin	117395	302.237	C15H10O07
621	Quinoline	91225	129.161	C09H07N01
626	Retinol acetate	127479	328.493	C22H32O02
638	Safrole	94597	162.187	C10H10O02
639	Salicylamide	65452	137.137	C07H07N01O02
640	o-Hydroxybenzoic acid	69727	138.121	C07H06O03
643	Shikimic acid	138590	174.151	C07H10O05
645	Simazine	122349	201.658	C07H12N05Cl01
646	Simetryne	1014706	213.306	C08H15N05S01
647	Simfibrate	14929114	469.358	C23H26O06Cl02
648	Sodium acetate, anhydrous	127093	82.034	C02H03O02Na01
652	Sodium benzoate	532321	144.104	C07H05O02Na01
658	Sodium chlorite	7758192	90.441	C00H00O02Na01Cl01
660	Sodium citrate	—	258.068	C06H06O07Na03
662	Sodium 5'-uridilate	—	367.160	C09H12N03O08Na02P01
663	Sodium dehydroacetate	4418262	190.129	C08H07O04Na01
664	Sodium di-malate	138090	178.051	C04H04O05Na02
665	Sodium dodecyl sulfate	151213	288.382	C12H26O04Na01S01
666	Sodium d-tartrate	868188	194.050	C04H04O06Na02
667	Sodium erythorbate	6381777	198.105	C06H07O06Na01
670	Sodium hypochlorite	7681529	74.442	C00H00O01Na01Cl01
671	Sodium hyposulfite	7772987	158.109	C00H00O03Na02S02
672	Sodium 5'-inosinate	4691650	392.170	C10H11N04O08Na02P01
674	Sodium lactate	72173	112.059	C03H05O03Na01
675	Sodium L-glutamate	142472	169.111	C05H08N01O04Na01
678	Sodium nitrate	7631994	84.994	C00H00N01O03Na01
679	Sodium nitrite	7632000	68.995	C00H00N01O02Na01
680	Sodium pantothenate	—	241.217	C09H16N01O05Na01
684	Sodium propionate	137406	96.060	C03H05O02Na01
688	Sodium sulfite	10102155	126.043	C00H00O03Na02S01
689	Sodium tripolyphosphate	13573187	367.862	C00H00O01Na05P03

(付表 1 続き)

690	Sodium 5'-uridilate	—	368.144	C09H11N02O09Na02P01
691	Sorbic acid	110441	112.127	C06H08O02
693	Sorbitol	50704	182.171	C06H14O06
699	Styrene	100425	104.151	C08H08
700	Styrene oxide	96093	120.150	C08H08O01
701	Succinic acid	110156	118.087	C04H06O04
702	Succinic anhydride	108305	100.073	C04H04O03
705	Sulpyrine	68893	333.341	C13H16N03Na01S01
709	Taurine	107357	125.147	C02H07N01O03S01
710	Terephthalate	100210	166.131	C08H06O04
711	Tetrachloroethylene	127184	165.834	C02H00Cl04
712	Tetrachloroisophalonitrile	1897456	265.913	C08H00N02Cl04
714	1-(2-Tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil	17902237	200.168	C08H09N02O03F01
717	l-Thanine	3081616	174.198	C07H14N02O03
718	Theophylline	58559	180.165	C07H08N04O02
719	Thiabendazole	148798	201.251	C10H07N03S01
725	Thioacetamide	62555	75.134	C02H05N01S01
726	Thiocarbamide	62556	76.122	C01H04N02S01
728	l-Threonine	72195	119.119	C04H09N01O03
730	Tolazamide	1156190	311.403	C14H21N03O03S01
731	Tolazoline	59983	160.218	C10H12N02
732	Tolbutamide	64777	270.351	C12H18N02O03S01
733	Toluene	108883	92.140	C07H08
734	o-Toluidine	95534	107.155	C07H09N01
735	p-Toluidine	106490	107.155	C07H09N01
736	4-o-Tolylazo-o-toluidine	97563	225.293	C14H15N03
737	Triamterene	396010	253.266	C12H11N07
738	Bromoform	—	252.731	C01H01Br03
739	tri-n-Butyl phosphate	126738	266.315	C12H27O04P01
740	1, 2, 3-Trichlorobenzene	87616	181.449	C06H03Cl03
741	1, 2, 4-Trichlorobenzene	120821	181.449	C06H03Cl03
742	1, 3, 5-Trichlorobenzene	108703	181.449	C06H03Cl03
743	1, 1, 1-Trichloroethane	71556	133.405	C02H03Cl03
744	Trichloroethylene	79016	131.389	C02H01Cl03
745	2, 2, 2-Trichloro-1-hydroxyethyl dimethyl	52686	257.436	C04H08O04P01Cl03
747	2, 4, 6-Trichlorophenol	83062	197.448	C06H03O01Cl03
748	Triethylenephosphoramide	52244	189.221	C06H12N03P01S01
750	1, 3, 5-trimethylbenzene	108678	120.194	C09H12
752	tris-Dibromopropyl phosphate	126727	697.611	C09H15O04P01Br06
753	tris-Dichloropropyl phosphate	78433	430.906	C09H15O04Cl06
755	trip-p-1 Acetate	—	211.266	C13H13N03
756	trip-p-2 Acetate	—	197.239	C12H11N03
760	dl-Triptophan	54126	204.227	C11H12N02O02
763	gamma-Udecalactone	104676	184.277	C11H20O02
764	Urea	57136	60.055	C01H04N02O01
765	Urethane	51796	89.093	C03H07N01O02
766	Uric acid	69932	168.110	C05H04N04O03
767	l-Valine	72184	117.147	C06H11N01O02
768	Vanillin	121335	152.148	C08H08O03
770	Vitamin a	59029	430.712	C29H50O02
776	Xanthurenic acid	59007	205.168	C10H07N01O04
777	Xylitol	87990	152.145	C05H12O05
778	d-(+)-Xylose	58866	150.129	C05H10O05
901	Propionaldehyde	123386	58.079	C03H06O01
902	Butyraldehyde	123728	72.106	C04H08O01

付表2 染色体異常試験データ

解析にはTR (c1e)を使用した。D20が1.00E+10と表記されているものはD20の指標では陰性であることを意味する。

No-C	化合物名	D20	TR (g)	TR (c1e)
002	Acetaldehyde	0.026	830	525
003	Acetanilide	1.00E+10	0	0
004	Acetohexamide	2.8	5	5
005	Acetone	40	0.35	0.35
006	Acetophenone	1.1	15	0
007	2-Acetylaminofluorene	0.48	40	0
008	1-Acetyl-1-methyl-2-nitroso-2-phenylhydr	0.45	2	16
009	1-Acetyl-1-methyl-2-phenylhydrazine	0.56	8	8
010	Acetylsalicylic acid	0.029	500	1
011	Acridine	0.042	500	300
012	Acrylamide	0.095	60	13.3
013	Acrylic acid	0.48	16	4
014	Acrylonitrile	0.027	680	266.6
017	dl-Alanine	1.00E+10	0	1
021	Allyl Caproate	1.00E+10	0	0
023	Ameltryne	1.00E+10	0	0
024	9-Aminoacridine Hydrochloride	0.00052	65000	32000
026	2-Amino-9h-pyrrolo [2,3,-b] indole acetate	0.74	14	0
028	2-Amino-3-methyl-9h-pyrrolo [2,3,-b] indole	0.16	84	32
029	2-Amino-4-Nitrophenol	0.015	800	133.3
030	2-Amino-5-Nitrophenol	0.004	3200	1200
032	Ammonium-bicarbonate	1.00E+10	0	0
037	dl-Amphetamine sulfate	1.00E+10	0	4
039	n-Amyl-n'-nitroguanidine	1.00E+10	0	0
040	n-Amyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	0.016	1200	1166.6
041	n-Amyl-n-nitrosourea	0.064	100	32
042	n-Amyl-n-nitrosourethane	0.026	630	379.7
043	n-Amylurea	1.00E+10	0	0
044	Amylurethane	1.00E+10	0	8
045	Aniline	0.78	24	2
046	Aniline hydrochloride	1.00E+10	0	0
047	p-Anisaldehyde	1.00E+10	0	8
048	p-Anisidine	0.14	130	32
051	Anthracene	0.024	450	0
055	l-Ascorbic acid	1.00E+10	0	3.3
056	l-Ascorbyl stearate	1.00E+10	0	0
057	l-Aspartic acid	1.00E+10	0	0
058	Aspirin anhydride	0.24	16	2
059	Atrazine	1.00E+10	0	0
061	Barbital	3.2	0.5	0
065	Benzaldehyde	0.97	18	0
066	Benzene	2.7	9.1	0
067	a-BHC	1.00E+10	0	5
068	gamma-BHC	1.00E+10	0	40
069	Benzo (a) pyrene	0.0095	2200	100
070	Benzoic acid	1.00E+10	0	0
071	Benzoin	0.026	230	50
072	Benzoyl peroxide	1.00E+10	0	5
075	Benzyl alcohol	1.00E+10	0	1
076	n-Benzyl-n-(benzoylaminoethyl) nitrosamine	1.00E+10	0	66.6
077	Benzyl cyanide	1.00E+10	0	0
078	s-Benzyl-diisopropyl-phosphorothioate	1.00E+10	0	31.94
079	n-Benzyl-n-(propionylaminomethyl) nitros	1.00E+10	0	0
080	Bis (2-bromo-2-propenyl) hydrogen phosphat	1.00E+10	0	0.75
081	1,3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea	0.0023	7200	7200

(付表2 続き)

083	Bis (dimethylthiocarbamoyl) disulfide	0.0011	30000	40000
087	Bromodichloromethane	0.27	33	8.3
088	Alpha-bromo-iso-butyric-acid	0.74	39	40.1
089	1-(4'-Bromophenylazo) benzyl hydroperoxide	1.00E+10	0	40
090	Alpha-bromopropionic acid	0.13	65	26.6
091	Butyrolin	1.00E+10	0	0
092	Butyrolinhydrochloride	1.00E+10	0	33.3
093	Busulfan	1.8	10	10
095	Butyl acetate	1.00E+10	0	0.5
096	n-Butyl-n-(acetoxymethyl) nitrosamine	0.016	1100	1079.4
097	n-sec-Butyl-n-(acetoxymethyl) nitrosamine	0.034	380	319.5
098	n-Butyl-n-(acetylaminomethyl) nitrosamine	1.00E+10	0	0
099	Butylated hydroxyanisole	1.00E+10	0	0
100	Butylated hydroxytoluene	1.00E+10	0	0
101	Butylbutanolamine	1.00E+10	0	0
102	Butylbutanol nitrosamine	1.4	11	0
103	n-Butyl-n-(3-carboxypropyl) nitrosamine	1.00E+10	0	6
104	n-Butyl-n-(methoxymethyl) nitrosamine	1.00E+10	0	0
105	n-sec-Butyl-n-(methoxymethyl) nitrosamine	1.2	7.5	1
106	n-Butyl-n'-nitroguanidine	1.00E+10	0	0
107	n-Butyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	0.013	2900	2866.6
108	n-Butyl nitrosourea	0.05	400	60
109	n-Butyl-n-nitrosourethane	0.035	750	333.3
110	Butylphthalylbutylglycolate	0.54	16	0
111	n-Butyl p-hydroxybenzoate	1.00E+10	0	0
112	Butylurea	1.00E+10	0	4
113	Butylurethane	1.00E+10	0	0
114	Butyric acid	1.00E+10	0	1
120	Caffeine	0.34	35	18
134	d-Camphor	1.00E+10	0	2
135	Caprolactam	17	0.83	0.3
136	Epsilon caprolactone	1.00E+10	0	0
139	Captafol	0.0037	3800	3000
147	Carbon tetrachloride	1.00E+10	0	4
161	m-Chloroaniline	1.00E+10	0	0
162	o-Chloroaniline	1.00E+10	0	8
163	p-Chloroaniline	0.27	33	0
164	Chlorobenzene	1.00E+10	0	0
166	Chlorpromazine hydrochloride	1.00E+10	0	133.3
167	Chlorpropamide	2	4	2
168	Chlorpyrifos	0.0012	270	8
171	Cinnamic aldehyde	0.0082	2100	600
172	Cinnamyl anthranilate	1.00E+10	0	0
173	Citral	1.00E+10	0	0
174	Citric acid	1.00E+10	0	0
176	Clofibrate	0.39	16	16
177	Clofibrilic acid	0.91	4	2
178	Cocaine hydrochloride	0.75	30	4
183	Creatinine	6.2	1.5	1.5
184	Curcumin	0.017	400	100
187	Cyclohexane (CYHA)	1.00E+10	0	0
188	Cyclohexylamine	0.19	78	0
189	Cyclophosphamide	0.0062	4200	1.5
192	Cytosine arabinoside	0.0086	11000	8000
195	Dehydroacetic acid	1.00E+10	0	0
196	2,4-Diaminoanisole sulfate	0.034	270	266.6
197	1,4-Diaminoanthraquinone	0.55	12	16
198	3,5-Diaminobenzoic acid	1.00E+10	0	1
200	Diazinon	1.00E+10	0	0

(付表2 続き)

204	Dibenzofuran	1.00E+10	0	0
205	Dibenzoylhydramine	1.00E+10	0	0
207	Dibromochloromethane	0.066	140	6.53
208	2,3-Dibromo-1-propanol	0.22	88	24
209	2,3-Dibromopropyl dihydrogen phosphate	1.00E+10	0	0
210	n-Dibutylamine	1.00E+10	0	0
211	n-Nitrosodl-n-butylamine	1.00E+10	0	0
212	n,n'-Dibutyl-n-nitrosourea	0.079	48	48
213	n,n'-Dibutylurea	1.00E+10	0	0
214	1,4-Dichlorobenzene	1.00E+10	0	800
215	1,1-Dichloroethane	1.00E+10	0	0
216	1,2-Dichloroethane	5.6	28	0
217	cis-1,2-Dichloroethylene	1.00E+10	0	0
218	1,1-Dichloroethylene	0.41	40	0
219	Methylenechloride	1.00E+10	0	1
220	2,3-Dichloro-1-propanol	0.05	320	7.5
221	1,3-Dichloropropene	0.07	110	100
222	2,2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate	0.13	80	8
223	Dicofol	1.00E+10	0	66.6
224	Diethanolnitrosamine	3.4	4	4
225	Diethylene glycol	75	0.1	20
226	n-Nitrosodiethylamine	3.4	4.7	0
227	Diethyl phthalate	1.00E+10	0	0
228	n,n-Diethyl-p-phenylenediamine	0.025	4800	4800
229	Diethylstilbestrol	1.00E+10	0	133.3
232	2,5-Dihydroxybiphenyl	1.00E+10	0	83.3
233	Diketobutyl-1-phenyl-2-methyl-2-nitros	0.51	45	28.8
234	Dimethoate	0.33	37	4
235	4,4'-Dimethoxydiphenylamine	0.021	800	233.3
236	2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine hydroc	1.00E+10	0	0
237	4-Dimethylaminoantipyrine	1.00E+10	0	0
238	7,12-Dimethylbenz(a)anthracene	0.025	980	0
239	1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride	0.071	320	222.2
240	n-Nitrosodimethylamine	0.34	63	0
241	3,4-Dimethylphenyl n-methylcarbamate	0.2	—	8
242	3,4-Dimethylphenyl n-nitroso-n-methylcar	0.0052	5100	5057
243	n,n-Dimethyl-p-phenylenediamine	0.01	900	800
244	Dimethyl terephthalate	1.00E+10	0	0
245	n,n-Dimethyltryptamine	1.00E+10	0	16
246	n,n'-di-Naphthyl-p-phenylenediamine	0.8	22	10
247	2,4-Dinitrochlorobenzene	0.0012	10000	12
248	1,3-Dinitropropylene	0.00072	19000	13000
249	1,6-Dinitropropylene	0.000058	450000	170000
250	1,8-Dinitropropylene	0.0000086	1200000	580000
252	Dinitrosodimethylamine	0.0037	4500	1833
253	2,4-Dinitrotoluene	1.00E+10	0	0
254	4,4-Diclyldiphenylamine	1.00E+10	0	2
255	Diphenyl	0.001	2100	0
256	4,4'-Diphenylmethane diisocyanate	0.0015	5	1
257	N-Nitrosodipropylamine	0.86	45	0
258	n,n'-di-sec-Butyl-p-phenylenediamine	1.00E+10	0	2500
266	1-Ephedrine hydrochloride	1.00E+10	0	4
267	Epichlorohydrin	0.039	520	520
269	Erythorbic acid	1.00E+10	0	16
271	Ethensamine	0.81	10	6
274	Ethionamide	0.54	18	6.6
275	di-Ethionine	1.00E+10	0	0
276	Ethyl acetate	16	0.33	0.4
277	Ethyl acetoacetate	1.00E+10	0	2

(付表2 続き)

278	Ethyl acrylate	0.0074	3200	1000
279	p-Ethylaniline	0.042	450	9.3
280	Ethylbenzene	1.00E+10	0	0
281	n-Ethyl-n-(benzoylaminoethyl) nitrosamine	1.00E+10	0	0
282	Ethyl butyrate	1.00E+10	0	0
283	Ethyl caproate	1.00E+10	0	2
284	Ethyl caprylate	1.00E+10	0	2
285	n-Ethyl-n-(3-carboxypropyl) nitrosamine	1.00E+10	0	0
286	Ethyl cinnamate	1.00E+10	0	63.9
287	1,1'-Ethylene-bis(1-nitrosourea)	0.0039	6400	2533.3
288	EDTA	1.00E+10	0	16
290	Ethylene glycol	12	1.6	0.016
291	n-Ethyl-n-(4-hydroxybutyl) nitrosamine	1.00E+10	0	0
292	Ethyl isovalerate	0.43	43	0
293	Ethyl methanesulfonate	1.00E+10	0	43
294	Ethyl n-ethylcarbamate	1.00E+10	0	0
295	n-Ethyl-n'-nitroguanidine	2.7	—	1
296	n-Ethyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	0.027	10000	10000
297	n-Ethyl-n-nitrosourea	0.063	110	8
298	n-Ethyl-n-nitrosourelthane	0.014	1100	1066.6
299	Ethyl n-methylcarbamate	1.00E+10	0	0
300	Ethyl phenylacetate	1.00E+10	0	4
301	Ethyl hydroxybenzoate	0.49	12	8
302	Ethyl propionate	1.00E+10	0	0
303	n-Ethylurea	1.00E+10	0	0
304	Ethyl vanillin	1.00E+10	0	0
305	Eugenol	0.16	110	32
307	Famotidine	1.00E+10	0	0
308	Fenitrothion	0.59	200	50
320	5-Fluorouracil	0.00038	16000	2240
321	Folic acid	1.00E+10	0	0
323	Food blue no. 2	1.00E+10	0	2
326	Food red no. 2	0.48	24	4
329	Food red no. 102	1.00E+10	0	2
333	Food yellow no. 4	1.8	3.5	1.5
335	Formaldehyde	0.018	730	600
337	Fumaric acid	1.00E+10	0	0
338	Furosemide	3.9	0.5	0
339	Furylfuramide	0.0055	4100	1800
345	Geosmin	1.00E+10	0	0
346	Geraniol	1.00E+10	0	32
348	Acetic acid	1.00E+10	0	1
349	Glibenclamide	1.00E+10	0	0
351	Gluconic acid solution	1.00E+10	0	0
352	Glucono delta lactone	1.00E+10	0	0
353	L-Glutamic acid	1.00E+10	0	0
354	Glyburide	0.87	2	0
355	Glycerin	1.00E+10	0	2
357	Glycidyl phenyl ether	0.022	400	400
360	Glycylpyramide	1.00E+10	0	2
361	Glycocyamine	1.00E+10	0	0.25
362	Glycodiazine	20	0.63	0.25
363	Glycol-ether diamine tetraacetic acid	1.00E+10	0	0.5
368	Guanidine carbonate	1.00E+10	0	0
372	Haloperidol	1.00E+10	0	0
373	Heptachlor	0.081	120	66.6
376	Hexachlorobenzene	1.00E+10	0	0
379	Hexane	6.3	—	0.015
383	Hydantonic acid	1.00E+10	0	0

(付表 2 続き)

384	Hrdralazine hydrochloride	0.0033	530	0
388	Hydrogen peroxide	0.1	230	144
389	4-Hydroxyacetanilide	0.023	580	150
390	3-Hydroxyanthranilic acid	1.00E+10	0	0
391	1,3-Hydroxy-kynurenine	1.00E+10	0	8
392	n-Hydroxymethyl dimethyl phosphonopropic	1.9	8	8
394	Indometacin	1.00E+10	0	8
403	Isoamyl acetate	1.00E+10	0	0
404	Isoamyl butyrate	1.00E+10	0	0
405	Isoamyl formate	1.00E+10	0	0
406	Isoamyl isovalerate	1.00E+10	0	16
407	Isoamyl propionate	1.00E+10	0	0
408	n-Isobutyl-n-(benzoylaminoethyl)nitrosamine	1.00E+10	0	0
409	n-Isobutyl-n'-nitroguanidine	1.00E+10	0	0
410	n-Isobutyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	0.01	770	766.6
411	n-Isobutyl-n-nitrosourea	0.052	200	12
412	n-Isobutyl-n-nitrosoureaethane	—	140	142.9
413	Isobutyl p-hydroxybenzoate	1.00E+10	0	66.6
414	Isobutylurea	1.00E+10	0	1
415	n-Isobutyl urethane	1.00E+10	0	0.5
416	l-Isoleucine	1.00E+10	0	0
417	Isoniazid	2.1	4.3	3.3
418	p-Isopropoxydiphenylamine	0.043	270	133.3
419	Isopropyl p-hydroxybenzoate	1.00E+10	0	0
423	Kojic acid	0.8	14	4
424	l-Kynurenine sulfate	0.68	4	0
425	Lactic acid	0.44	22	1.5
426	Lactic acid	1.00E+10	0	0
429	Levodopa	0.041	230	233.3
430	Linalool synthetic	1.00E+10	0	8
435	l-Lysine monohydrochloride	1.00E+10	0	0
442	Malathion	0.061	110	62.5
443	Maleic anhydride	0.16	40	32
444	dl-Malic acid	1.00E+10	0	0
445	Maltol	0.025	300	13.3
446	Mecamylamine hydrochloride	0.048	200	200
447	d-(-)-Mannitol	1.00E+10	0	2
449	Mefenamic acid	1.00E+10	0	0
450	Menthol	1.00E+10	0	10
452	6-Mercaptopurine	0.0011	11000	2000
453	Mescaline sulfate	1.00E+10	0	0
454	Metformin hydrochloride	2.4	0.5	0.5
455	Methamphetamine hydrochloride	1.00E+10	0	0
456	Methoxychlor	1.00E+10	0	0
458	n-Methyl-n-(acetylaminomethyl)nitrosamine	6.7	3	0.25
459	n-Methyl-n'-acetyl-nitrosourea	0.061	330	328
460	Methyl acetylcholine	1.00E+10	0	1
461	n-Methyl-n'-acetylurea	7.5	1.3	0
462	Methyl acrylate	0.0046	530	533.3
463	4-Methylaminoantipyrine	4.3	4.4	0.3
464	Methylazoxymethanol acetate	0.099	130	31.9
465	Methyl benzoate	1.00E+10	0	6
468	2-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	0.13	130	0
469	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	0.042	420	0
470	alpha-Methylidopa	0.49	48	48
471	4,4-Methylene-bis(2-chloroaniline)	1.00E+10	0	0
472	dl-Methylephedrine hydrochloride	1.00E+10	0	32
473	n-Methylguanidine	1.00E+10	0	0
475	2-MIB exo	1.00E+10	0	40

(付表 2 続き)

476	Methyl methanesulfonate	0.011	2300	2325
477	n-Methyl-n'-nitroguanidine	3.1	2.5	0
478	n-Methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	0.0028	6400	6400
479	4-(n-Methyl-n-nitroso)aminoantipyrine	1.00E+10	0	1
480	n-Methyl-n-nitroso-methyl anthranilate	1.00E+10	0	0
481	n-Methyl-n-nitrosourea	0.031	580	100
482	n-Methyl-n-nitrosoureaethane	0.005	3400	866.6
483	Methyl n-methylantranilate	1.00E+10	0	8
484	3-Methylphenyl n-methylcarbamate	0.074	48	16
485	3-Methylphenyl n-nitroso n-methylcarbamate	0.0058	9300	9333
486	Methyl p-hydroxybenzoate	0.73	6	32
487	7-Methylquinoline	1.00E+10	0	0
488	8-Methylquinoline	1.00E+10	0	1.6
489	Methyl salicylate	1.00E+10	0	8
491	Methylurea	1.00E+10	0	0
493	Miltin ff	1.00E+10	0	0
495	Mononitrosoametryne	1.00E+10	0	0
496	Mononitrosoametryne	1.00E+10	0	31.9
497	Monosodium fumarate	1.00E+10	0	0.5
501	Musk xylol	1.00E+10	0	8.3
502	Naphthalene	0.068	280	0
503	alpha-Naphthoquinoline	0.061	100	66.6
504	beta-Naphthoquinoline	0.032	200	100
505	alpha-Naphthylamine	0.0039	3200	33.3
506	Naphthyl n-methylcarbamate	0.014	800	200
507	Naphthyl n-nitroso-n-methylcarbamate	0.005	4900	4933
511	Nicotinamide	3.1	4.7	3
512	Nicotine	1.00E+10	0	2
513	Nicotinic acid	1.00E+10	0	0
514	Nitrobenzene	1.00E+10	0	0
515	2-Nitrofluorene	1.00E+10	0	50
516	Nitrofurantoin	0.062	50	0
517	Nitrofurazone	0.15	87	100
519	Nitroguanidine	3.6	3	3
520	4-Nitro-o-phenylenediamine	0.041	270	66.6
521	2-Nitro-p-phenylenediamine	0.013	800	266.6
522	1-Nitropyrene	1.00E+10	0	0
523	6-Nitroquinoline	1.00E+10	0	0
525	Nitrosoatrazine	0.0056	1000	10000
526	n-Nitrosodiphenylamine	0.092	240	0
527	Nitrosohydantonic acid	0.042	300	304
528	Nitrosoprometryne	1.00E+10	0	0
529	Nitrososilmaxine	0.0063	2100	1066
530	m-Nitrotoluene	1.00E+10	0	0
531	o-Nitrotoluene	1.00E+10	0	0
532	p-Nitrotoluene	1.00E+10	0	0
534	Nyldrin hydrochloride	1.00E+10	0	50
536	Oxalic acid	1.00E+10	0	0
540	Paraverine hydrochloride	0.18	96	16
543	Pentachlorophenol	0.27	83	0
547	Perillaldehyde	0.038	240	80
550	Phenacetin	0.76	38	5
551	Phenanthrene	1.00E+10	0	0
552	Phencyclidine hydrochloride	0.81	29	0
553	Phenobarbital	1.00E+10	0	0
554	Phenobarbital sodium	1.00E+10	0	0
555	Phentolamine	1.00E+10	0	0
556	l-Phenylalanine	4.8	0.5	0.5
557	2-Phenyl-1,4-benzoquinone	1.00E+10	0	500

(付表2 続き)

559	Phenylbutazone	0.84	3	0
560	m-Phenylenediamine	0.026	730	200
561	o-Phenylenediamine	0.0035	3000	2000
562	p-Phenylenediamine	0.34	34	40
563	n-Phenyl-1-naphthylamine	1.00E+10	0	0
564	o-Phenylphenol	1.00E+10	0	20
565	o-Phenylphenol sodium salt	1.00E+10	0	33.3
568	n-Butyl phthalate	1.00E+10	0	0
570	Phytic acid	1.00E+10	0	0
571	Piperonyl butoxide	1.00E+10	0	0
589	Prometryne	1.00E+10	0	4
591	Propazine	1.00E+10	0	0
592	beta-Propiolactone	0.013	2300	2267
593	Propylene glycol	20	0.15	0.063
596	Propyl gallate	0.015	800	800
597	n-Propyl-n'-nitroguanidine	1.00E+10	0	0
598	n-Propyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine	0.0095	700	700
599	n-Propyl-n-nitrosourea	0.065	510	32
600	n-Propyl-n-nitrosourethane	0.018	470	498.6
610	Propylurea	1.00E+10	0	0.38
602	Propylurethane	1.00E+10	0	0
606	Pterosisin a	1.00E+10	0	0
607	Pterosisin b	1.00E+10	0	0
608	Pterosisin c	1.00E+10	0	0
609	Pterosisin f	1.00E+10	0	0
610	Pterosisin l	1.00E+10	0	0
613	Pyrene	0.039	1000	8
616	Prydine	1.00E+10	0	0
617	Pyridoxine hydrochloride	1.00E+10	0	0.5
619	Quercetin	0.033	330	333.3
621	Quinoline	0.45	47	8
626	Resinol acetate	1.00E+10	0	133.3
638	Safrone	0.17	120	0
639	Salicylamide	1.1	6	0
640	o-Hydroxybenzoic acid	1.5	4	4
643	Shikimic acid	1.00E+10	0	0
645	Simazine	1.00E+10	0	66.6
646	Simetryne	1.00E+10	0	8
647	Simfibrate	1.00E+10	0	0
648	Sodium acetate, anhydrous	1.00E+10	0	1
652	Sodium benzoate	1.2	0.5	0
658	Sodium chlorite	0.02	500	500
660	Sodium citrate	1.00E+10	0	0
662	Sodium 5'-cytidilate	42	0.13	0.1
663	Sodium dehydroacetate	2.6	1	1
664	Sodium di-malate	1.00E+10	0	0
665	Sodium dodecyl sulfate	1.00E+10	0	0
666	Sodium d-tartrate	27	0.13	0.13
667	Sodium erythorbate	1.00E+10	0	0
670	Sodium hypochlorite	0.5	18	6
671	Sodium hyposulfite	1.00E+10	0	0
672	Sodium 5'-inosinate	14	0.8	0.4
674	Sodium lactate	1.00E+10	0	0
675	Sodium l-glutamate	1.00E+10	0	0.2
678	Sodium nitrate	6	1	1
679	Sodium nitrite	0.32	52	16
680	Sodium pantothenate	1.00E+10	0	0
684	Sodium propionate	1.00E+10	0	0
688	Sodium sulfite	1.00E+10	0	0

(付表2 続き)

689	Sodium tripolyphosphate	1.00E+10	0	0
690	Sodium 5'-uridilate	28	0.19	0.125
691	Sorbic acid	1.00E+10	0	0
693	Sorbitol	1.00E+10	0	0
699	Styrene	0.3	52	0
700	Styrene oxide	0.0057	1500	1533
701	Succinic acid	1.00E+10	0	0
702	Succinic anhydride	1.00E+10	0	16
705	Sulpyrine	0.37	55	54.6
709	Taurine	1.00E+10	0	2
710	Terephthalate	1.00E+10	0	0
711	Tetrachloroethylene	1.00E+10	0	4
712	Tetrachloroisophalonitrile	1.00E+10	0	666.6
714	1-(2-Tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil	0.27	26	4
717	l-Thanine	1.00E+10	0	0
718	Theophylline	0.32	23	21
719	Thiabendazole	1.00E+10	0	0
725	Thioacetamide	1.00E+10	0	0
726	Thiocarbamide	1.00E+10	0	0
728	l-Threonine	1.00E+10	0	11
730	Tolazamide	1.00E+10	0	0
731	Tolazoline	0.011	960	382.2
732	Tolbutamide	1.00E+10	0	0
733	Toluene	1.00E+10	0	2
734	o-Toluidine	1.1	11	1.3
735	p-Toluidine	0.014	920	40
736	4-o-Tolylazo-o-toluidine	1.00E+10	0	0
737	Triamterene	0.0003	9300	4000
738	Bromoform	0.22	52	8.8
739	tri-n-Butyl phosphate	1.00E+10	0	0
740	1, 2, 3-Trichlorobenzene	1.00E+10	0	66.6
741	1, 2, 4-Trichlorobenzene	1.00E+10	0	31.9
742	1, 3, 5-Trichlorobenzene	1.00E+10	0	0
743	1, 1, 1-Trichloroethane	1.00E+10	0	2
744	Trichloroethylene	1.00E+10	0	8
745	2, 2, 2-Trichloro-1-hydroxyethyl dimethyl	0.15	64	0
747	2, 4, 6-Trichlorophenol	2.8	5.3	0
748	Triethylenephosphoramidate	0.00056	55000	14894
750	1, 3, 5-trimethylbenzene	1.00E+10	0	0
752	tris-Dibromopropyl phosphate	0.19	8	16
753	tris-Dichloropropyl phosphate	0.22	96	31.9
755	trp-p-1 Acetate	0.0013	13000	12800
756	trp-p-2 Acetate	0.0057	3500	2000
760	dl-Triptophan	1.00E+10	0	2
763	gamma-Udecalactone	1.00E+10	0	8
764	Urea	10	2	0.81
765	Urethane	12	0.13	0
766	Uric acid	1.00E+10	0	0.5
767	l-Valine	1.00E+10	0	1
768	Vanillin	1.00E+10	0	4
770	Vitamin a	1.00E+10	0	2
776	Xanthurenic acid	1.00E+10	0	133.3
777	Xylitol	33	0.5	0.5
778	d-(-)-Xylose	1.00E+10	0	0
901	Propionaldehyde	1.00E+10	0	125
902	Butylaldehyde	1.00E+10	0	75

付表3 方法1での官能基分類

通し 番号	大分類	細分類	官能基	
非環官能基				
1	1	1	$-\text{CH}_3$	
2	1	2	$>\text{CH}_2$	
3	1	3	$>\text{CH}-$	
4	1	4	$>\text{C}<$	
5	1	5	$=\text{CH}_2$	
6	1	6	$=\text{CH}-$	
7	1	7	$=\text{C}<$	
8	1	8	$=\text{C}=\text{C}$	
9	1	9	$\equiv\text{CH}$	
10	1	10	$\equiv\text{C}-$	
環内官能基				
11	1	11	$-\text{CH}_2-$	
12	1	12	$>\text{CH}-$	
13	1	13	$>\text{C}<$	
14	1	14	$=\text{CH}-$	
15	1	15	$=\text{C}<$	
ハロゲン				
16	2	1	$-\text{F}$	
17	2	2	$-\text{Cl}$	
18	2	3	$-\text{Br}$	
19	2	4	$-\text{I}$	
酸素				
20	3	1	$-\text{OH}$	アルコール
21	3	2	$-\text{OH}$	フェノール
22	3	3	$-\text{O}-$	非環
23	3	4	$-\text{O}-$	環内
24	3	5	$>\text{C}=\text{O}$	非環カルボニル
25	3	6	$>\text{C}=\text{O}$	環内カルボニル
26	3	7	$\text{O}=\text{CH}-$	アルデヒド
27	3	8	$-\text{COOH}$	カルボン酸
28	3	9	$-\text{COO}-$	エステル
29	3	15	$-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$	β -カルボニルエステル
30	3	10	$=\text{O}$	その他の二重結合酸素
窒素				
31	4	1	$-\text{NH}_2$	
32	4	2	$>\text{NH}$	非環
33	4	3	$>\text{NH}$	環内
34	4	4	$>\text{N}-$	非環
35	4	5	$-\text{N}=\text{N}-$	非環
36	4	6	$-\text{N}=\text{N}-$	環内
37	4	7	$-\text{CN}$	
38	4	8	$-\text{NO}_2$	
39	4	15	NH_3	
イオウ				
40	5	1	$-\text{SH}$	
41	5	2	$-\text{S}-$	非環
42	5	3	$-\text{S}-$	環内

明することを試みる。方法2では、構成原子の連なりに注目し、さらに原子構成種をその化学特性から付表4のように分類しておく。当該分子にその分類で番号づけた原子列が存在するかどうかを判断し、存在状況とTR値との関係を統計的に解析する。

2.3 判定指標の概要

解析では簡単のために、分子中の官能基あるいは原子団が独立してTR値に寄与していると想定し、官能基が複合して活性を発揮する効果は考慮しないことにする。想定する活性発現のモデルをつぎに示す。

$$TR = f(\text{注目する官能基の有無}) + \text{他の要因} \quad (2)$$

この式をもとに、問題とする官能基が分子中に存在するとき1、存在しないとき0となる関数 δ を考え、この関数すなわち注目する官能基により、TRの挙動がどの程度説明されるかを検討する。つまり上式の f を $a\delta$ と考え、

$$TR = a\delta + b \quad (3)$$

とする。ここに a および b は定数である。さらにTRの変動(平方和) S_T 中の、 δ による説明量は、 S^2_{Td}/S_{dd} であり、残りの変動である $S_T - S^2_{Td}/S_{dd}$ と比べて無視できない量であるかを、両変動の自由度で補正した比である以下の F を算定することによって判断することにした。

$$F = \frac{\frac{S^2_{Td}}{S_{dd}}}{\frac{S_T - \frac{S^2_{Td}}{S_{dd}}}{n-2}} \quad (4)$$

ここで、 n はデータ数、 S_{dd} は δ の平方和、 S_{Td} はTRと δ の積和である。 F 値の有意な水準はデータ数によるが、1.5~2.5以上程度であればTRの挙動の説明因子として考えることができよう。また、 S_{Td}/S_{dd} (= a)は影響の方向を表し、これが正ならば、原子団の存在は染色体異常を誘発する効果をもち、負ならばその反対の効果をもつことが想定できる。

付表4 方法2での原子分類

番号	原子	備考
1	Csp3	sp3炭素
2	Csp2	アルケンsp2炭素, C2 (a)
3	Csp2	カルボニルsp2炭素, C2 (0)
4	Csp	sp炭素
6	O	一重結合酸素
7	O	=O カルボニル酸素
8	Nsp3	sp3窒素
9	Nsp2	sp2窒素
10	Nsp	sp窒素
29	NO2	NO2窒素
11	F	フッ素
12	Cl	塩素
13	Br	臭素
14	I	ヨウ素
15	S	-S- サルファイド
16	S+	>S+ S-フォニウム
17	S	>S=O Sオキサイド
18	S	>SO2 サルフォン
19	Si	シラン
22	C	シクロプロパン性炭素
25	P	>P- フォスフィン

付表5 方法1による各官能基のF値
サフィクスrはその原子が環内原子であることを意味する

官能基	F (2)	F (3)	F (4)	a (4)
非環性				
-CH ₃	0.543	0.235	2.993	-0.394
>CH ₂	0.992	7.436	3.838	-0.165
>CH-	0.322	2.019	1.316	0.415
>C<	0.123	0.887	0.195	0.382
=CH ₂	0.083	0.302	0.470	0.628
=CH-	0.118	0.648	5.748	0.893
=C<	0.031	0.523	3.085	-1.050
≡C-	0.007	0.080	0.806	-1.572
環性				
-CrH ₂ -	0.168	1.059	5.352	-0.400
>CrH-	0.145	0.066	2.950	0.483
>Cr<	0.090	0.556	2.224	1.075
=CrH-	0.542	1.129	1.128	-0.098
=Cr<	3.164	4.669	3.565	0.298
ハロゲン				
-F	0.014	0.325	1.337	2.340
-Cl	0.256	0.477	0.050	-0.056
-Br	0.049	0.717	1.521	0.578
酸素				
-OH	0.265	7.231	4.287	-0.544
Ar-OH	0.186	3.737	4.267	0.875
-O-	0.368	1.233	0.215	-0.118
-Or-	0.113	0.093	0.000	-0.011
>C=O	0.353	0.002	1.373	-0.573
>Cr=O	0.247	0.419	5.780	-1.106
O=CH-	0.080	1.254	3.166	1.803
-COOH	0.981	8.209	10.609	-1.264
-COO-	0.557	1.030	0.019	0.049
=O	0.374	0.712	0.023	-0.042
-CO-O-CO-	0.021	0.357	0.901	1.829
窒素				
-NH ₂	0.551	1.204	1.560	0.462
>NH	0.459	1.471	0.259	-0.205
>NrH	0.189	0.475	0.876	0.459
>N-	0.174	17.767	15.824	1.710
-N=	0.272	15.909	4.608	1.193
-Nr=	0.192	0.278	1.766	-0.390
-CN	0.015	1.865	0.978	1.382
-NO ₂	19.226	12.766	4.916	1.213
イオウ				
-SH	0.001	3.349	3.809	6.686
-S-	0.082	4.127	7.024	1.543
-Sr-	0.035	1.542	4.154	-3.242

2. 4 解析結果

方法1における各官能基のF値を付表5に示す。F(2)は上式で算定したF値を表す。F(3)はTR値に $\log(\text{TR}+0.1)$ なる変換を行った場合のF値である。F(4)はTR値に上記の変換を行い、全官能基で説明を行ったのち、当該の官能基を説明変数から取り除くときのF値である。a(4)はF(4)と同じ条件下での回帰係数である。このときの回帰の状況は、 $R^2=0.220$, $R'^2=0.150$, $R''^2=0.081$, 自由度=424, $\sigma_e=3.284$ であった。

付表6は、方法2によって、任意の2原子の連なりが染色体異常誘発性に及ぼす影響度をF値とa値で表したものである。付表7は3原子連なりを解析の対象とした場合である。さらに4原子連なりの場合の解析結果を付表8に示すが、3原子の場合とほぼ同様の結果なのでF値が0.1以上となった原子列のみを示した。

以上の解析から、染色体異常を生起する可能性のある原子団を示したものが付表9である。まず付表6, 7から、F値が極めて大きく、染色体異常誘発能が強く示唆される原子団として、 $\text{C}=\text{C}-\text{NO}_2$, $\text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}<$, $-\text{NO}_2$ をあげることができる。方法1による付表5の結果でも窒素化合物のF値が大きいことがわかる。つぎに、付表6, 7より、F値が1.5以上であり、染色体異常誘発性原子団としての可能性がややあるものとして $\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{O}^-$ があげられる。また、a値が正でF値が比較的大きいことから、可能性が考えられるものとして、 $\text{C}-\text{C}=\text{O}$ があげられる。

解析結果の特徴として指摘しうることは、ニトロ基とカルボニル基が染色体異常誘発性に寄与している可能性が高い点である。また、本解析ではハロゲン化物の染色体異常誘発性に対する寄与が認められなかった点も特徴である。

付表6 2原子連なりとの関係解析結果(方法2)

原子列	解析データ数	F	a
2-29	C2(a) N(02)	21	12.146 0.328E+05
7-29	O= N(02)	36	6.715 0.193E+05
1-06	Csp3 -O-	162	1.629 -0.541E+04
1-02	Csp3 C2(0)	114	0.903 -0.447E+04
2-03	C2(a) C2(0)	93	0.781 -0.446E+04
2-06	C2(a) -O-	87	0.640 -0.415E+04
3-08	C2(0) Nsp3	95	0.626 -0.396E+04
1-03	Csp3 C2(0)	114	0.580 0.359E+04
2-08	C2(a) Nsp3	123	0.525 -0.332E+04
2-09	C2(a) Nsp2	83	0.332 -0.303E+04
3-06	C2(0) -O-	138	0.314 0.249E+04
1-08	Csp3 Nsp3	166	0.306 0.234E+04
15-15	-S- -S-	2	0.279 0.163E+05
2-12	C2(a) Cl	37	0.228 -0.353E+04
8-09	Nsp3 Nsp2	60	0.227 -0.286E+04
7-09	O= Nsp2	56	0.196 -0.274E+04
6-25	-O- >P-	19	0.134 -0.368E+04
7-18	O= >SO2	20	0.133 -0.357E+04
1-12	Csp3 Cl	20	0.103 -0.314E+04
2-18	C2(a) >SO2	14	0.100 -0.369E+04
7-25	O= >P-	14	0.099 -0.368E+04
8-08	Nsp3 Nsp3	14	0.098 -0.366E+04
1-15	Csp3 -S-	13	0.074 -0.331E+04
6-18	-O- >SO2	11	0.069 -0.347E+04
1-01	Csp3 Csp3	251	0.066 -0.105E+04
8-18	Nsp3 >SO2	9	0.064 -0.369E+04
9-09	Nsp2 Nsp2	9	0.064 -0.368E+04
1-13	Csp3 Br	8	0.056 -0.367E+04
2-02	C2(a) C2(a)	267	0.056 -0.968E+03
3-07	C2(0) O=	234	0.032 -0.723E+03
1-09	Csp3 Nsp2	4	0.027 -0.357E+04
1-18	Csp3 >SO2	5	0.027 -0.320E+04
8-29	Nsp3 N(02)	13	0.027 -0.200E+04
6-06	-O- -O-	4	0.026 -0.352E+04
1-25	Csp3 >P-	3	0.021 -0.369E+04
7-17	O= >S=O	3	0.021 -0.369E+04
4-10	Csp Nsp	3	0.018 -0.338E+04
8-25	Nsp3 >P-	2	0.015 0.376E+04
2-11	C2(a) F	3	0.014 -0.294E+04
2-13	C2(a) Br	2	0.014 -0.367E+04
3-03	C2(0) C2(0)	2	0.014 -0.367E+04
6-17	-O- >S=O	2	0.014 -0.369E+04
6-12	-O- Cl	2	0.012 -0.344E+04
2-04	C2(a) Csp	2	0.011 -0.322E+04
2-15	C2(a) -S-	17	0.011 -0.110E+04
1-04	Csp3 Csp	1	0.007 -0.369E+04
3-15	C2(0) -S-	1	0.007 -0.369E+04
4-07	Csp O=	1	0.007 -0.369E+04
4-09	Csp Nsp2	1	0.007 -0.369E+04
6-15	-O- -S-	1	0.007 -0.369E+04
6-29	-O- N(02)	1	0.007 -0.369E+04
7-08	O= Nsp3	1	0.007 -0.369E+04
8-17	Nsp3 >S=O	1	0.007 -0.369E+04
15-17	-S- >S=O	1	0.007 -0.369E+04
3-09	C2(0) Nsp2	4	0.006 -0.169E+04
15-25	-S- >P-	6	0.004 -0.118E+04
8-15	Nsp3 -S-	1	0.000 -0.688E+03

付表7 3原子連なりとの関係解析結果(方法2)

原子列	解析データ数	F	a
2-02-29	C2(a) C2(a) N(02)	21	12.146 0.328E+05
2-29-07	C2(a) N(02) O=	21	12.146 0.328E+05
3-01-08	C2(0) Csp3 Nsp3	25	8.722 0.261E+05
7-29-07	O= N(02) O=	36	6.715 0.192E+05
1-01-03	Csp3 Csp3 C2(0)	72	1.825 0.754E+04
1-01-01	Csp3 Csp3 Csp3	170	1.704 -0.548E+04
1-03-06	Csp3 C2(0) -O-	76	1.620 0.694E+04
5-01-06	H Csp3 -O-	153	1.488 -0.524E+04
1-01-06	Csp3 Csp3 -O-	121	1.060 -0.473E+04
1-02-02	Csp3 C2(a) C2(a)	112	0.878 -0.444E+04
2-02-03	C2(a) C2(a) C2(0)	93	0.781 -0.445E+04
2-03-07	C2(a) C2(0) O=	93	0.781 -0.445E+04
1-01-08	Csp3 Csp3 Nsp3	121	0.703 0.386E+04
2-15-15	C2(a) -S- -S-	1	0.691 0.363E+05
15-02-15	-S- C2(a) -S-	1	0.691 0.363E+05
7-03-08	O= C2(0) Nsp3	95	0.626 -0.396E+04
2-02-06	C2(a) C2(a) -O-	86	0.624 -0.409E+04
1-03-07	Csp3 C2(0) O=	114	0.580 0.358E+04
1-06-03	Csp3 -O- C2(0)	64	0.479 -0.404E+04
1-01-02	Csp3 Csp3 C2(a)	54	0.409 -0.403E+04
2-02-08	C2(a) C2(a) Nsp3	83	0.401 -0.333E+04
1-08-03	Csp3 Nsp3 C2(0)	64	0.353 -0.347E+04
2-03-06	C2(a) C2(0) -O-	46	0.347 -0.397E+04
5-01-08	H Csp3 Nsp3	165	0.315 0.237E+04
6-03-07	-O- C2(0) O=	138	0.314 0.248E+04
8-03-08	Nsp3 C2(0) Nsp3	38	0.242 -0.363E+04
2-02-12	C2(a) C2(a) Cl	32	0.235 -0.386E+04
1-08-09	Csp3 Nsp3 Nsp2	56	0.196 -0.273E+04
7-09-08	O= Nsp2 Nsp3	56	0.196 -0.273E+04
8-02-09	Nsp3 C2(a) Nsp2	53	0.192 -0.279E+04
1-06-02	Csp3 -O- C2(a)	26	0.187 -0.378E+04
2-01-06	C2(a) Csp3 -O-	26	0.185 -0.375E+04
5-02-09	H C2(a) Nsp2	25	0.176 -0.374E+04
1-03-08	Csp3 C2(0) Nsp3	23	0.157 -0.369E+04
2-02-09	C2(a) C2(a) Nsp2	47	0.152 -0.259E+04
1-08-01	Csp3 Nsp3 Csp3	47	0.150 -0.257E+04
2-08-03	C2(a) Nsp3 C2(0)	24	0.138 -0.339E+04
2-03-08	C2(a) C2(0) Nsp3	21	0.134 -0.348E+04
7-18-07	O= >SO2 O=	20	0.133 -0.356E+04
1-08-02	Csp3 Nsp3 C2(a)	55	0.132 -0.226E+04
2-08-02	C2(a) Nsp3 C2(a)	26	0.129 -0.313E+04
2-09-02	C2(a) Nsp2 C2(a)	45	0.126 -0.242E+04
1-06-25	Csp3 -O- >P-	17	0.120 -0.367E+04
6-25-06	-O- >P- -O-	17	0.120 -0.367E+04
3-01-06	C2(0) Csp3 -O-	15	0.107 -0.368E+04
2-02-18	C2(a) C2(a) >SO2	14	0.100 -0.368E+04
2-18-07	C2(a) >SO2 O=	14	0.100 -0.368E+04
1-03-02	Csp3 C2(0) C2(a)	14	0.099 -0.367E+04
6-25-07	-O- >P- O=	14	0.099 -0.368E+04
8-02-08	Nsp3 C2(a) Nsp3	23	0.094 -0.285E+04
5-03-07	H C2(0) O=	13	0.085 -0.353E+04
3-08-08	C2(0) Nsp3 Nsp3	11	0.078 -0.367E+04
5-01-15	H Csp3 -S-	12	0.078 -0.352E+04
9-02-09	Nsp2 C2(a) Nsp2	20	0.078 -0.273E+04
2-08-08	C2(a) Nsp3 Nsp3	10	0.071 -0.367E+04
1-06-01	Csp3 -O- Csp3	15	0.070 -0.299E+04

(付表7 続き)

1-08-08	Csp3	Nsp3	Nsp3	10	0.070	-0.3655E+04
1-01-12	Csp3	Csp3	C1	15	0.069	-0.2963E+04
1-02-08	Csp3	C2(a)	Nsp3	10	0.069	-0.3644E+04
2-01-02	C2(a)	Csp3	C2(a)	10	0.069	-0.3633E+04
5-01-12	H	Csp3	C1	15	0.069	-0.2960E+04
6-18-07	-O-	SO2	O=	11	0.069	-0.3466E+04
8-25-15	Nsp3	P-	S-	1	0.066	0.1121E+05
1-02-06	Csp3	C2(a)	-O-	9	0.064	-0.3684E+04
2-09-09	C2(a)	Nsp2	Nsp2	9	0.064	-0.3683E+04
2-18-08	C2(a)	SO2	Nsp3	9	0.064	-0.3687E+04
7-18-08	O=	SO2	Nsp3	9	0.064	-0.3687E+04
9-02-15	Nsp2	C2(a)	-S-	11	0.064	-0.3336E+04
6-03-08	-O-	C2(a)	Nsp3	19	0.061	-0.2485E+04
3-08-03	C2(0)	Nsp3	C2(0)	11	0.058	-0.3187E+04
2-01-08	C2(a)	Csp3	Nsp3	8	0.057	-0.3680E+04
3-02-08	C2(0)	C2(a)	Nsp3	8	0.057	-0.3676E+04
3-08-09	C2(0)	Nsp3	Nsp2	22	0.057	-0.2274E+04
2-06-02	C2(a)	-O-	C2(a)	9	0.056	-0.3438E+04
12-01-12	C1	Csp3	C1	9	0.053	-0.3346E+04
3-01-03	C2(0)	Csp3	C2(0)	7	0.049	-0.3674E+04
5-01-13	H	Csp3	Br	7	0.049	-0.3675E+04
8-02-15	Nsp3	C2(a)	-S-	5	0.049	-0.4313E+04
3-02-06	C2(0)	C2(a)	-O-	7	0.048	-0.3635E+04
2-03-02	C2(a)	C2(0)	C2(a)	7	0.047	-0.3564E+04
1-15-02	Csp3	-S-	C2(0)	7	0.043	-0.3420E+04
3-08-18	C2(0)	Nsp3	SO2	6	0.043	-0.3687E+04
6-02-09	-O-	C2(a)	Nsp2	6	0.043	-0.3687E+04
8-01-08	Nsp3	Csp3	Nsp3	6	0.042	-0.3677E+04
2-01-03	C2(a)	Csp3	C2(0)	7	0.039	-0.3521E+04
6-01-09	-O-	Csp3	Nsp3	10	0.039	-0.2747E+04
5-02-08	H	C2(a)	Nsp3	11	0.038	-0.2570E+04
1-02-09	Csp3	C2(a)	Nsp2	12	0.037	-0.2421E+04
2-18-06	C2(a)	SO2	-O-	5	0.036	-0.3686E+04
1-01-13	Csp3	Csp3	Br	5	0.035	-0.3666E+04
1-02-01	Csp3	C2(a)	Csp3	5	0.035	-0.3638E+04
2-02-15	C2(a)	C2(a)	-S-	6	0.035	-0.3332E+04
6-25-15	-O-	P-	-S-	5	0.035	-0.3659E+04
5-02-06	H	C2(a)	-O-	5	0.029	-0.3323E+04
1-03-01	Csp3	C2(0)	Csp3	4	0.028	-0.3687E+04
2-15-02	C2(a)	-S-	C2(a)	4	0.028	-0.3655E+04
12-02-12	C1	C2(a)	C1	4	0.028	-0.3683E+04
1-18-06	Csp3	SO2	-O-	5	0.027	-0.3201E+04
1-18-07	Csp3	SO2	O=	5	0.027	-0.3201E+04
2-08-29	C2(a)	Nsp3	N(02)	13	0.027	-0.2003E+04
5-01-09	H	Csp3	Nsp2	4	0.027	-0.3575E+04
5-01-18	H	Csp3	SO2	5	0.027	-0.3201E+04
7-29-08	O=	N(02)	Nsp3	13	0.027	-0.2003E+04
23-08-29	H(NH)	Nsp3	N(02)	13	0.027	-0.2003E+04
2-08-09	C2(a)	Nsp3	Nsp2	17	0.024	-0.1638E+04
1-01-25	Csp3	Csp3	P-	3	0.021	-0.3686E+04
1-02-15	Csp3	C2(a)	-S-	3	0.021	-0.3688E+04
1-25-06	Csp	P-	-O-	3	0.021	-0.3686E+04
2-06-25	C2(a)	-O-	P-	3	0.021	-0.3669E+04
2-09-08	C2(a)	Nsp2	Nsp3	3	0.021	-0.3654E+04
3-06-03	C2(0)	-O-	C2(0)	3	0.021	-0.3672E+04
5-01-25	H	Csp3	P-	3	0.021	-0.3686E+04
5-02-12	H	C2(a)	C1	3	0.021	-0.3652E+04
6-01-06	-O-	Csp3	-O-	3	0.021	-0.3688E+04

(付表7 続き)

21-06-25	H(OH)	-O-	P-	3	0.021	-0.3687E+04
1-06-18	Csp3	-O-	SO2	4	0.020	-0.3094E+04
1-01-15	Csp3	Csp3	-S-	4	0.020	-0.2923E+04
2-06-03	C2(a)	-O-	C2(0)	10	0.016	-0.1732E+04
1-08-25	Csp3	Nsp3	P-	2	0.015	-0.3759E+04
6-02-29	-O-	C2(a)	N(02)	3	0.015	-0.3055E+04
8-25-08	Nsp3	P-	Nsp3	2	0.015	-0.3759E+04
1-02-03	Csp3	C2(a)	C2(0)	2	0.014	-0.3648E+04
1-15-01	Csp3	-S-	Csp3	2	0.014	-0.3688E+04
1-15-25	Csp3	-S-	P-	2	0.014	-0.3641E+04
1-25-07	Csp3	P-	O=	2	0.014	-0.3684E+04
2-15-15	C2(a)	Csp3	-S-	2	0.014	-0.3672E+04
2-02-11	C2(a)	C2(a)	F	3	0.014	-0.2940E+04
2-02-13	C2(a)	C2(a)	Br	2	0.014	-0.3668E+04
2-08-18	C2(a)	Nsp3	SO2	2	0.014	-0.3688E+04
3-01-13	C2(0)	Csp3	Br	2	0.014	-0.3655E+04
3-01-15	C2(0)	Csp3	-S-	2	0.014	-0.3655E+04
3-02-09	C2(0)	C2(a)	Nsp2	2	0.014	-0.3621E+04
3-03-07	C2(0)	C2(0)	O=	2	0.014	-0.3674E+04
5-02-15	H	C2(a)	-S-	2	0.014	-0.3688E+04
6-01-09	-O-	Csp3	Nsp2	2	0.014	-0.3652E+04
6-02-08	-O-	C2(a)	Nsp3	2	0.014	-0.3687E+04
6-17-07	-O-	S=O	O=	2	0.014	-0.3688E+04
8-08-09	Nsp3	Nsp3	Nsp2	2	0.014	-0.3666E+04
12-01-13	C1	Csp3	Br	2	0.014	-0.3681E+04
13-01-13	Br	Csp3	Br	2	0.014	-0.3681E+04
1-01-09	Csp3	Csp3	Nsp2	2	0.013	-0.3497E+04
1-09-02	Csp3	Nsp2	C2(a)	2	0.013	-0.3497E+04
2-02-04	C2(a)	C2(a)	Csp	2	0.011	-0.3222E+04
2-04-10	C2(a)	Csp	Nsp	2	0.011	-0.3222E+04
9-02-12	Nsp2	C2(a)	C1	6	0.011	-0.1831E+04
1-01-18	Csp3	Csp3	SO2	1	0.007	-0.3686E+04
1-02-13	Csp3	C2(a)	Br	1	0.007	-0.3687E+04
1-03-03	Csp3	C2(0)	C2(0)	1	0.007	-0.3659E+04
1-03-09	Csp3	C2(0)	Nsp2	1	0.007	-0.3688E+04
1-04-10	Csp3	Csp	Nsp	1	0.007	-0.3688E+04
1-06-06	Csp3	-O-	-O-	1	0.007	-0.3648E+04
1-08-07	Csp3	Nsp3	O=	1	0.007	-0.3656E+04
1-09-08	Csp3	Nsp2	Nsp3	1	0.007	-0.3656E+04
1-09-09	Csp3	Nsp2	Nsp2	1	0.007	-0.3648E+04
1-15-15	Csp3	-S-	-S-	1	0.007	-0.3684E+04
1-25-01	Csp3	P-	Csp3	1	0.007	-0.3688E+04
1-25-15	Csp3	P-	-S-	1	0.007	-0.3688E+04
2-01-04	C2(a)	Csp3	Csp	1	0.007	-0.3688E+04
2-01-09	C2(a)	Csp3	Nsp2	1	0.007	-0.3648E+04
2-01-12	C2(a)	Csp3	C1	1	0.007	-0.3588E+04
2-03-15	C2(a)	C2(0)	-S-	1	0.007	-0.3688E+04
2-08-17	C2(a)	Nsp3	S=O	1	0.007	-0.3688E+04
2-09-04	C2(a)	Nsp2	Csp	1	0.007	-0.3687E+04
2-15-03	C2(0)	-S-	C2(0)	1	0.007	-0.3688E+04
3-02-03	C2(0)	C2(a)	C2(0)	1	0.007	-0.3687E+04
3-02-11	C2(0)	C2(a)	F	1	0.007	-0.2566E+04
3-03-03	C2(0)	C2(0)	C2(0)	1	0.007	-0.3659E+04
3-03-06	C2(0)	C2(0)	-O-	1	0.007	-0.3688E+04
3-03-08	C2(0)	C2(0)	Nsp3	1	0.007	-0.3659E+04
3-06-06	C2(0)	-O-	-O-	1	0.007	-0.3683E+04
5-03-06	H	C2(0)	-O-	1	0.007	-0.3688E+04
5-03-08	H	C2(0)	Nsp3	1	0.007	-0.3688E+04

(付表7 続き)

6-01-25	-O-	Csp3	P-	1	0.007	-0.3688E+04
6-51-17	-O-	-S-	S=O	1	0.007	-0.3688E+04
6-17-06	-O-	S=O	-O-	1	0.007	-0.3688E+04
6-17-15	-O-	S=O	-S-	1	0.007	-0.3688E+04
6-18-06	-O-	SO2	-O-	1	0.007	-0.3688E+04
6-25-08	-O-	P-	Nsp3	1	0.007	-0.3687E+04
6-29-07	-O-	N(02)	O=	1	0.007	-0.3688E+04
7-03-15	O=	C2(0)	-S-	1	0.007	-0.3688E+04
7-04-09	O=	Csp	Nsp2	1	0.007	-0.3687E+04
7-08-09	O=	Nps3	Nsp2	1	0.007	-0.3656E+04
7-17-07	O=	S=O	O=	1	0.007	-0.3688E+04
7-17-08	O=	S=O	Nsp3	1	0.007	-0.3688E+04
7-17-15	O=	S=O	-S-	1	0.007	-0.3688E+04
7-25-15	O=	P-	-S-	1	0.007	-0.3656E+04
8-01-18	Nsp3	Csp3	SO2	1	0.007	-0.3634E+04
8-08-17	Nsp3	Nsp3	S=O	1	0.007	-0.3688E+04
15-15-25	-S-	-S-	P-	1	0.007	-0.3684E+04
15-25-15	-S-	P-	-S-	1	0.007	-0.3626E+04
23-08-25	H(NH)	Nsp3	P-	1	0.007	-0.3687E+04
25-06-25	P-	-O-	P-	1	0.007	-0.3688E+04
2-09-03	C2(a)	Nsp2	C2(0)	4	0.006	-0.1688E+04
7-03-09	O=	C2(0)	Nsp2	4	0.006	-0.1688E+04
6-06-21	-O-	-O-	C1	1	0.005	-0.3188E+04
8-03-09	Nsp3	C2(0)	Nsp2	3	0.002	-0.1021E+04
1-15-08	Csp3	-S-	Nsp3	1	0.000	-0.6882E+03
2-02-02	C2(a)	C2(a)	C2(a)	232	0.000	-0.9850E+02
3-08-15	C2(0)	Nsp3	-S-	1	0.000	-0.6882E+03
12-01-15	C1	Csp3	-S-	1	0.000	-0.6882E+04

付表8 4原子連なりとの関係解析結果(方法2)

原子列	対象化合物数	F	a
7-29-2-2	O= N(02) C2(a) C2(a)	21	12.146 0.3282E+05
29-2-2-2	N(02) C2(a) C2(a) C2(a)	21	12.146 0.3282E+05
8-1-3-6	Nsp3 Csp3 C2(0) -O-	23	9.817 0.2890E+05
8-1-3-7	Nsp3 Csp3 C2(0) O=	25	8.772 0.2618E+05
6-3-1-1	-O- C2(0) Csp3 Csp3	57	2.765 0.1025E+05
7-3-1-1	O= C2(0) Csp3 Csp3	72	1.825 0.7548E+04
7-3-2-2	O= C2(0) C2(a) C2(a)	93	0.781 -0.4457E+04
1-1-1-1	Csp3 Csp3 Csp3 Csp3	93	0.727 -0.4300E+04
15-2-8-1	-S- C2(a) Nsp3 Csp3	1	0.691 0.3631E+05
15-2-15-15	-S- C2(a) -S- -S-	1	0.691 0.3631E+05
15-15-2-8	-S- -S- C2(a) Nsp3	1	0.691 0.3631E+05
2-2-2-1	C2(a) C2(a) C2(a) Csp3	88	0.621 -0.4059E+04
6-2-2-2	-O- C2(a) C2(a) C2(a)	77	0.535 -0.3965E+04
3-2-2-2	C2(0) C2(a) C2(a) C2(a)	67	0.531 -0.4180E+04
8-1-1-1	Nsp3 Csp3 Csp3 Csp3	73	0.527 -0.4030E+04
7-3-6-1	O= C2(0) -O- Csp3	64	0.479 -0.4040E+04
6-1-1-1	-O- Csp3 Csp3 Csp3	64	0.473 -0.4016E+04
2-2-1-1	C2(a) C2(a) Csp3 Csp3	51	0.380 -0.3971E+04
3-6-1-1	C2(0) -O- Csp3 Csp3	52	0.373 -0.3895E+04
8-2-2-2	Nsp3 C2(a) C2(a) C2(a)	77	0.362 -0.3260E+04
7-3-8-1	O= C2(0) Nsp3 Csp3	64	0.353 -0.3471E+04
6-3-2-2	-O- C2(0) C2(a) C2(a)	46	0.347 -0.3974E+04
3-1-1-1	C2(0) Csp3 Csp3 Csp3	42	0.309 -0.3891E+04
2-15-15-2	C2(a) -S- -S- C2(a)	2	0.279 0.1632E+05
1-1-8-1	Csp3 Csp3 Nsp3 Csp3	34	0.231 -0.3710E+04
2-1-1-1	C2(a) Csp3 Csp3 Csp3	32	0.229 -0.3821E+04
1-3-6-1	Csp3 C2(0) -O- Csp3	30	0.205 -0.3679E+04
3-8-1-1	C2(0) Nsp3 Csp3 Csp3	37	0.202 -0.3317E+04
2-2-6-1	C2(a) C2(a) -O- Csp3	26	0.187 -0.3785E+04
6-1-2-2	-O- Csp3 C2(a) C2(a)	26	0.185 -0.3757E+04
12-2-2-2	C1 C2(a) C2(a) C2(a)	26	0.185 -0.3763E+04
7-9-8-1	O= Nsp2 Nsp3 Csp3	54	0.183 -0.2699E+04
8-3-8-1	Nsp3 C2(0) Nsp3 Csp3	28	0.166 -0.3428E+04
2-3-6-1	C2(a) C2(0) -O- Csp3	23	0.161 -0.3740E+04
6-1-1-6	-O- Csp3 Csp3 -O-	25	0.153 -0.3490E+04
9-8-1-1	Nsp2 Nsp3 Csp3 Csp3	39	0.150 -0.2824E+04
3-2-2-1	C2(0) C2(a) C2(a) Csp3	20	0.142 -0.3680E+04
1-2-2-1	Csp3 C2(a) C2(a) Csp3	23	0.139 -0.3470E+04
9-2-8-1	Nsp2 C2(a) Nsp3 Csp3	35	0.139 -0.2840E+04
7-3-8-2	O= C2(0) Nsp3 C2(a)	24	0.138 -0.3390E+04
8-3-2-2	Nsp3 C2(0) C2(a) C2(a)	21	0.134 -0.3486E+04
9-2-2-2	Nsp2 C2(a) C2(a) C2(a)	44	0.133 -0.2516E+04
6-2-2-6	-O- C2(a) C2(a) -O-	19	0.129 -0.3604E+04
8-2-2-3	Nsp3 C2(a) C2(a) C2(0)	19	0.126 -0.3563E+04
3-8-2-2	C2(0) Nsp3 C2(a) C2(a)	22	0.124 -0.3362E+04
6-2-2-3	-O- C2(a) C2(a) C2(0)	18	0.120 -0.3566E+04
6-25-6-1	-O- P- -O- Csp3	16	0.113 -0.3675E+04
2-2-8-1	C2(a) C2(a) Nsp3 Csp3	23	0.112 -0.3113E+04
2-2-8-2	C2(a) C2(a) Nsp3 C2(a)	23	0.108 -0.3064E+04
2-8-1-1	C2(a) Nsp3 Csp3 Nsp3	34	0.107 -0.2532E+04
7-3-1-6	O= Csp3 -O- -O-	15	0.107 -0.3684E+04
7-18-2-2	O= SO2 C2(a) C2(a)	14	0.100 -0.3687E+04
18-2-2-2	SO2 C2(a) C2(a) C2(a)	14	0.100 -0.3687E+04

付表9 染色体異常を生起する可能性のある原子団

原子団	整理番号	F 値
可能性が強いもの		
$\begin{array}{c} \text{—C=C—NO}_2 \\ \quad \end{array}$	2-02-29 2-29-07	12.146
$\begin{array}{c} \text{O=C—C—N<} \\ \quad \\ \text{—NO}_2 \end{array}$	3-01-080 7-29-07	8.772 6.715
可能性がややあるもの		
$\begin{array}{c} \quad \\ \text{—C—C—C=O} \\ \quad \end{array}$	1-01-03	1.825
$\begin{array}{c} \\ \text{—C—C=O} \\ \quad \\ \text{O}^- \end{array}$	1-03-06	1.620
可能性が考えられるもの		
$\begin{array}{c} \\ \text{—C—C=O} \\ \quad \end{array}$	1-03	0.580

第3節 副生成物と染色体異常誘発性との関係に関する実験

本研究でとりあげている4種の消毒剤はともに酸化剤であり、ともにカルボニル化合物、ニトロ化合物を生成する可能性が高い。本節では、染色体異常誘発の可能性が指摘されたカルボニル化合物、ニトロ化合物が各消毒処理によっていかに生成するか、およびこれら副生成物と処理水の染色体異常誘発性との関係について実験的に検討した。

3.1 実験方法

(1) 濃縮琵琶湖水の作製と消毒処理方法

第3章の方法と同様。

(2) 副生成物の分析

カルボニル基の選択的還元剤として水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) がある。このときカルボニル基はアルコールとなる。 NaBH_4 はカルボニル基は還元するが、カルボキシル基、エステル、アミド、エーテル、ニトロ基、 $\text{C}=\text{C}$ 二重結合などは還元しないという^{2) 3)}。カルボニル基が還元されればその分だけ吸光度が減少する(付図4 (1), (2), (3), (4) 参照) ので、還元前後の吸光度差を測定することによりカルボニル基量を見積もることができる⁴⁾。本方法の測定値と他のカルボニル基定量法による値との相関関係も得られている⁵⁾。 NaBH_4 を0.2%となるように添加して48時間放置し、 E_{260} の初期 E_{260} に対する減少量を求めた。

ニトロ基は、スズと塩酸で還元し、生成したアミンをジフェニルピクリルヒドラジルで呈色させて測定した⁶⁾。還元前の濃縮湖水や消毒処理水中にもアミンは含まれているので、還元後のアミン量から還元前のアミン量を差し引いてニトロ基量を求めた。例として、濃縮湖水中および塩素処理水中に含まれる、アミン量とニトロ基量の関係を付図1に示す。なお、この方法では主として芳香環を有するニトロ基を測定している。

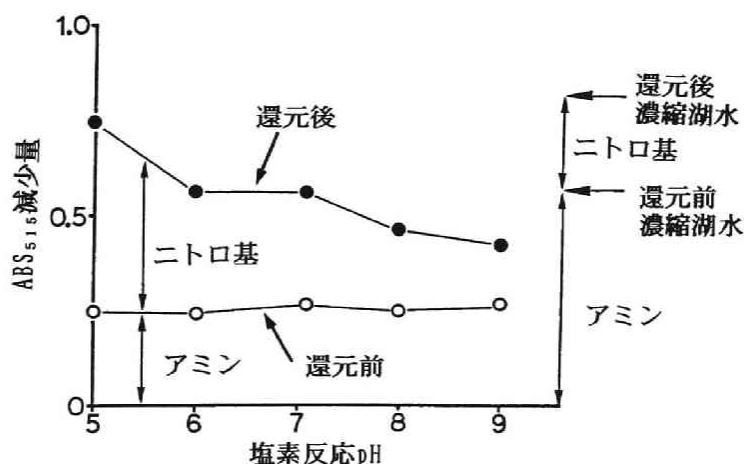
(3) 染色体異常試験と画像解析

第3章の方法と同様。

3. 2 実験結果

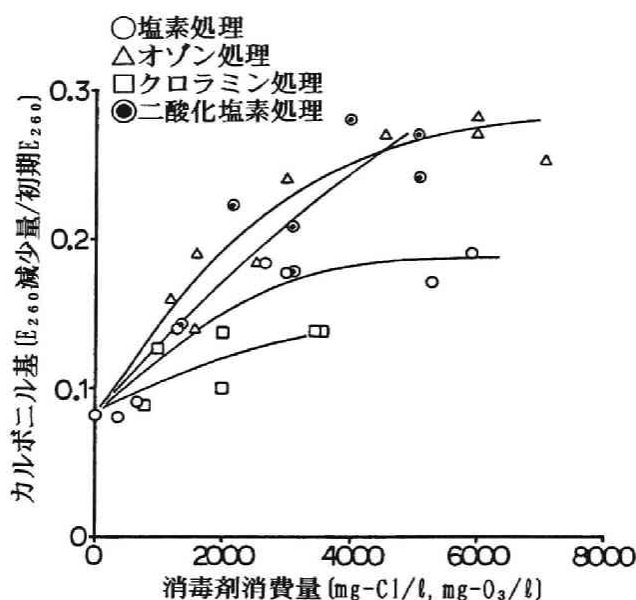
(1) カルボニル基生成量との関係

各消毒処理によって生成したカルボニル基を付図2に示す。二酸化塩素とオゾン

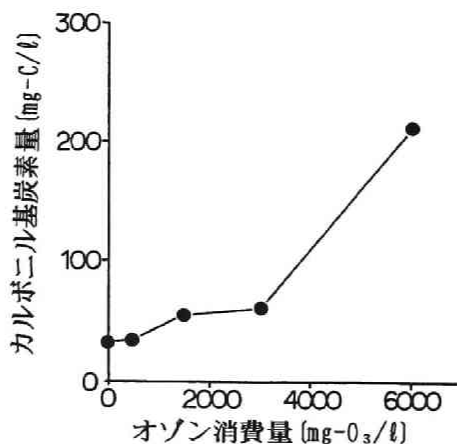


付図1 濃縮湖水中および塩素処理水中のアミン量とニトロ基量の分析

処理水中の濃度が最も高く、ついで塩素処理水、さらにクロラミン処理では塩素処理の場合の半分程度が生成した。全体として、消毒剤の酸化力が大きいものほどカルボニル化合物を多く生成させる傾向にあるといえる。また酸化力が小さく消毒力が弱いとされるクロラミンでもカルボニル化合物を生成しうることを指摘しうる。第3章ではクロラミン処理水の染色体異常誘発性は認められなかったが、有害な副生成物はやはり生成していると考えer必要がある。ところで付図2では E_{260} に基づいているため生成量の相対的比較しかできない。そこでオゾン処理水についてカルボニル基炭素量をバニリン反応法⁷⁾で定量した。結果を付図3に示す。この結果、



付図2 消毒処理によるカルボニル化合物の生成

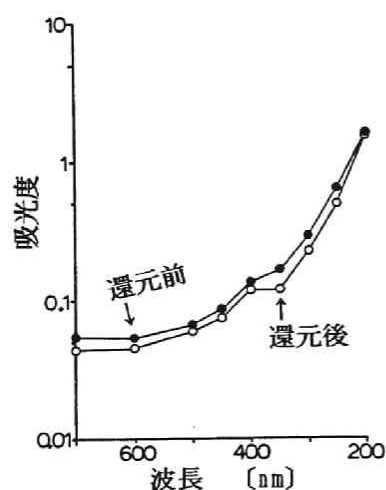


付図3 オゾン処理によるカルボニル化合物の生成

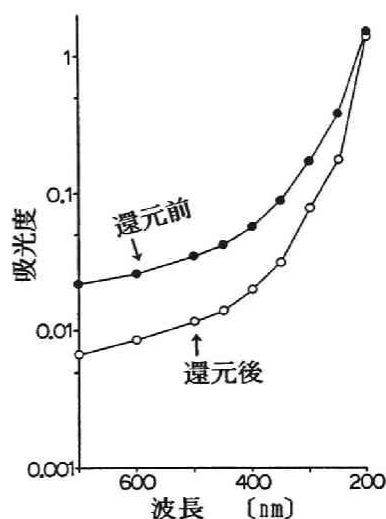
オゾン処理水における最高生成量はおよそ210mg-C/lに相当することがわかった。
第3章に示したオゾン処理水中の低分子アルデヒドはいずれも10mg/l以下であり、それら以外に多量のカルボニル化合物が生成していることがわかる。

染色体異常誘発性と副生成物との関係をさらに考察するため、消毒処理時のpHをかえることにより、消毒剤と有機物との反応性を変える実験を、塩素とオゾンで行った。

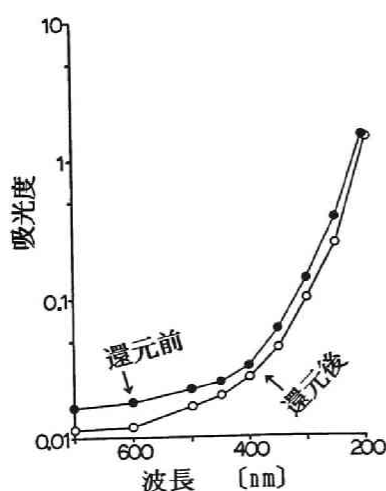
塩素処理の結果については、第3章中で、残存 E_{260} 値、染色体異常誘発性と生成クロロホルム濃度、生成低分子アルデヒドについて図3.8～図3.10に示した。結果



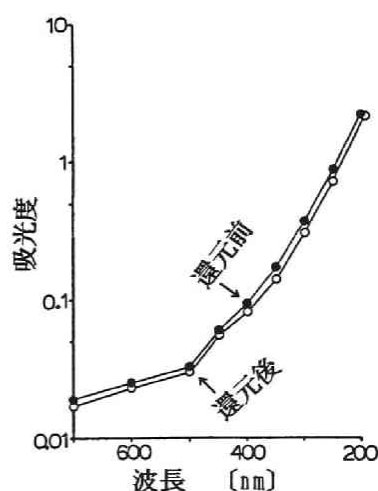
付図4 (1) 濃縮湖水中のカルボニル化合物



付図4 (2) 塩素処理 (pH5) 水中のカルボニル化合物



付図4 (3) 塩素処理 (pH7) 水中のカルボニル化合物

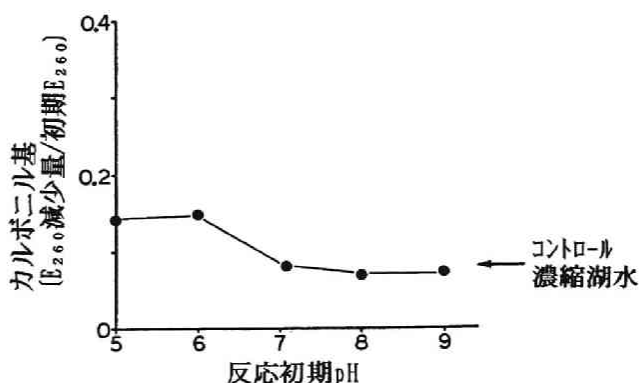


付図4 (4) 塩素処理 (pH9) 水中のカルボニル化合物

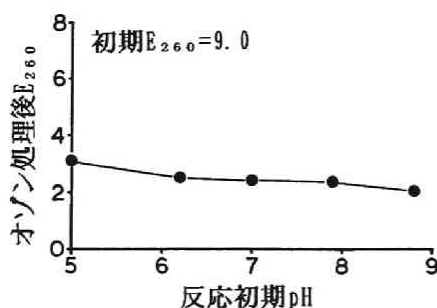
は、塩素酸化がより進んだ低pH域の処理水の染色体異常誘発性が強かった。また、クロロホルムの生成傾向は染色体異常誘発性とは逆傾向を示し、低分子アルデヒドの生成傾向との関係は明確ではなかった。

そこで塩素処理水中の含有カルボニル基量を測定した。付図4(1),(2),(3),(4)に還元前後の吸光度差を測定したものを示す。低pH処理水の方が、還元前後の吸光度差が大きく、カルボニル基含有量が多いことがわかる。塩素処理pHと含有カルボニル基量との関係を示したものが付図5である。濃縮湖水中にもカルボニル基は含まれているが、低pH域でカルボニル基が多く生成する傾向が認められ、染色体異常誘発性の強さとの対応関係を認めうる。

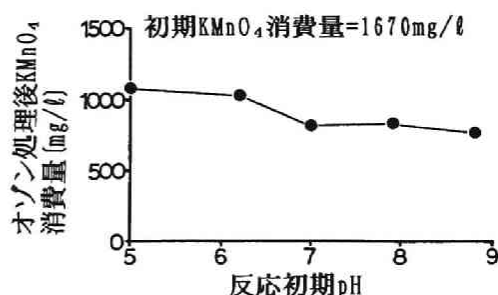
つぎにオゾン処理をpHを変化させて行った結果を示す。付図6に処理後の E_{260} 、付図7に処理後の過マンガン酸カリウム消費量を示す。いずれも高pH側でより減少している傾向が僅かにある。付表10には処理前後のpHを示す。付図8は、処理水の染色体異常誘発性を調べたものである。高pH域での処理水の方が染色体異常誘発性が強い傾向が認められた。付図9は、処理水中のカルボニル基量を測定したもので



付図5 塩素処理によるカルボニル化合物生成に対するpHの影響



付図6 オゾン処理による E_{260} 減少に対するpHの影響

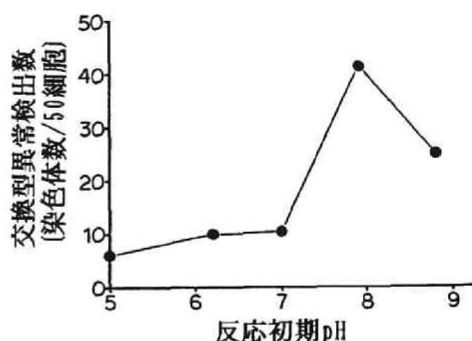


付図7 オゾン処理による $KMnO_4$ 消費量減少に対するpHの影響

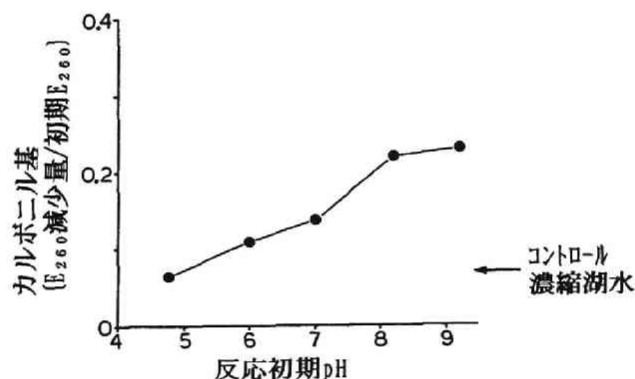
ある。やはり高pH域での処理水中の濃度が高く、染色体異常誘発性の強さに対応していた。C₀からC₃までの直鎖低分子アルデヒドを測定した結果でも、高pH域の処理水中濃度の方が高かった（付図10）。

付表10 オゾン処理におけるpH変化

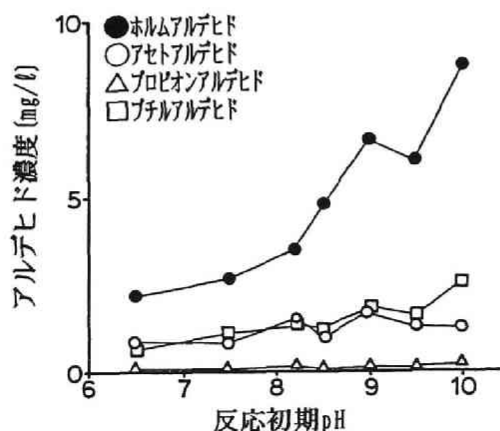
初期pH	オゾン処理後pH
5.04	4.72
6.21	6.18
7.04	7.02
7.87	7.75
8.81	8.10



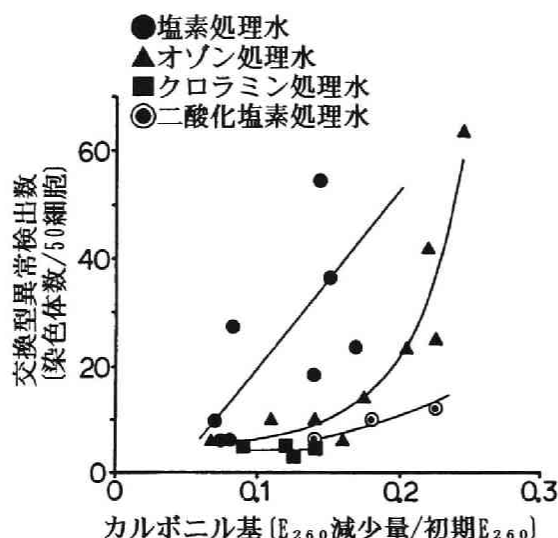
付図8 オゾン処理水の染色体異常誘発性に対するpHの影響



付図9 オゾン処理によるカルボニル化合物生成に対するpHの影響



付図10 オゾン処理による低分子アルデヒド生成に対するpHの影響

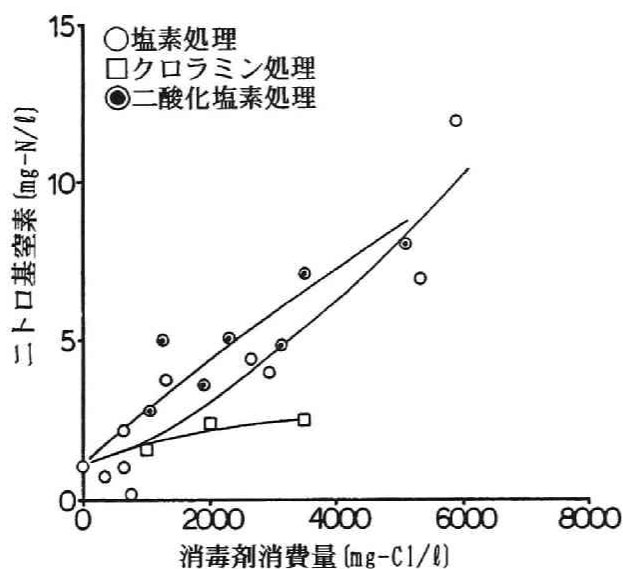


付図11 消毒処理水中の含有カルボニル化合物量と染色体異常誘発性との関係

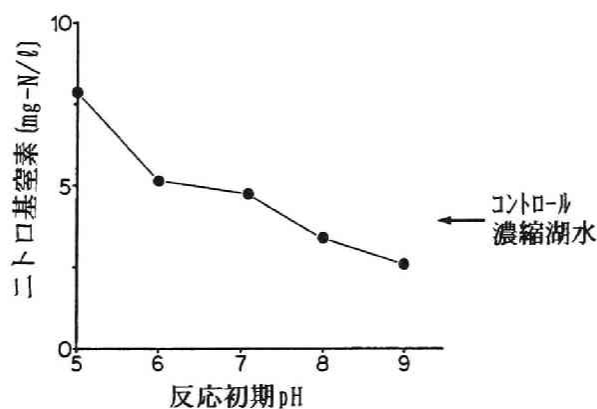
以上の結果をまとめて、含有カルボニル基量と染色体異常誘発性との関係を付図11に示す。塩素処理水とオゾン処理水については、pHを変えて処理した処理水の結果を含めている。含有カルボニル基量が多い程染色体異常誘発性も強い傾向を認めうる。しかし同量の含有カルボニル基量であっても、塩素処理水の染色体異常誘発性が他の3種に比べて強いのが特徴である。これはカルボニル化合物に加えて有機塩素化合物が染色体異常誘発性に寄与していることを予想させる。一方第3章では、二酸化塩素とクロラミンについても、塩素化も進行していると推察されたが、付図11の結果から、有機塩素化合物が生成していたとしても、同じ生成カルボニル量で比較した場合、染色体異常誘発性はオゾン処理水を上回るものではないことがわかる。すなわち、二酸化塩素処理水、クロラミン処理水の染色体異常誘発性に対する有機塩素化合物の寄与は、仮にあるとしても僅かであると推察できる。

(2) ニトロ基生成量との関係

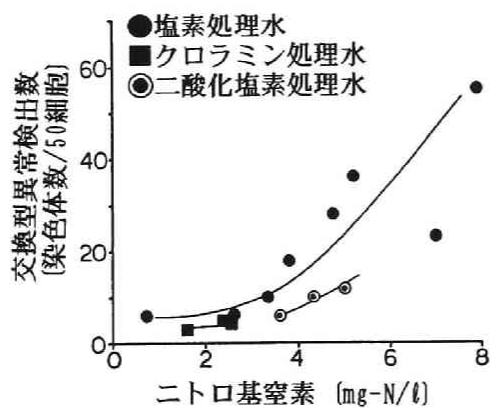
各消毒処理によって生成したニトロ基を付図12に示す。オゾン処理水を除く3種について生成が認められ、その範囲ではカルボニル基と同様、消毒剤の酸化力が大きいものほどニトロ基を多く生成させる傾向にあった。付図13は、pHを変えて塩素処理した処理水中の含有ニトロ基を測定したものであり、染色体異常誘発性との対応関係が認められた。以上の結果をまとめて、含有ニトロ基量と染色体異常誘発性との関係を付図14に示す。含有ニトロ基が多い処理水ほど染色体異常誘発性も強かった。



付図12 消毒処理によるニトロ化合物の生成



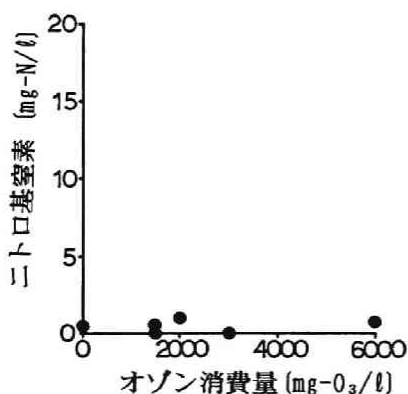
付図13 塩素処理によるニトロ化合物の生成に対するpHの影響



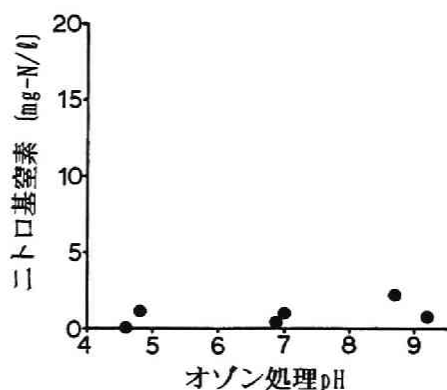
付図14 消毒処理水中の含有ニトロ基量と染色体異常誘発性との関係

一方、オゾン処理水中のニトロ基は、この測定方法では有意な生成は認められなかった。pH7における処理水を分析した結果を付図15に、pHを変えて処理したものを分析した結果を付図16に示す。この測定方法では主として芳香環を有するニトロ基を測定しているが、オゾンによって芳香環の開裂が進むためと推察される。そこで、パラフィン系のニトロ基を測定⁶⁾したところ、オゾン処理による生成は認められた。結果を付図17に示すが、曝気を継続すると減少傾向があらわれた。付図18は、pHを変えてオゾン処理した処理水中のニトロパラフィン系を測定したものであるが、高pH側で生成量が低下する傾向にあった。結局オゾン処理水については、含有ニトロ基量と染色体異常誘発性との関係は認められなかった。

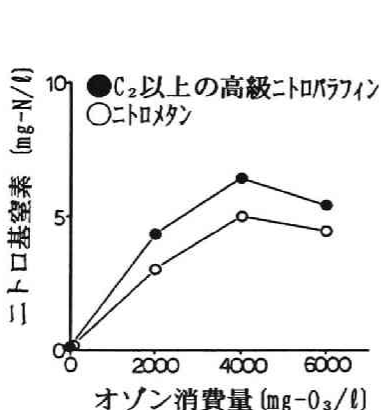
また、生成量を比較すると、カルボニル基の最高生成量が約210mg-C/lであるのに対し、付図14からわかるようにニトロ基の最高生成量は約8mg-N/lと、ニトロ基



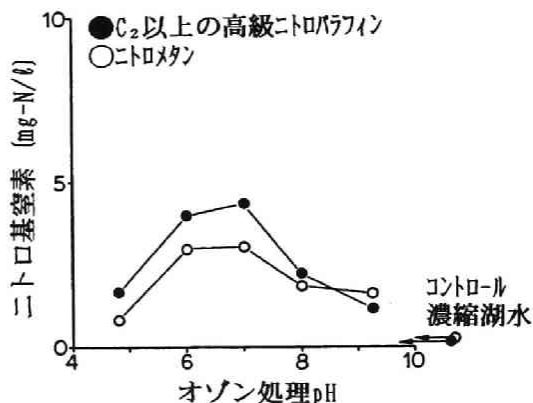
付図15 オゾン処理水中の(芳香族)ニトロ化合物の測定



付図16 オゾン処理水中の(芳香族)ニトロ化合物の測定



付図17 オゾン処理水中のパラフィン系ニトロ化合物の測定



付図18 オゾン処理水中のパラフィン系ニトロ化合物の測定

に比べてカルボニル基の生成量の方がはるかに多いことがわかった。

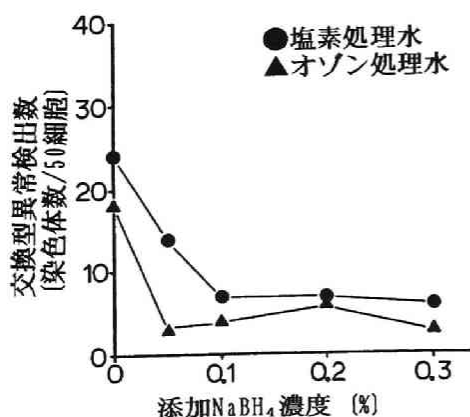
(3) 還元処理の影響

つぎに塩素処理水およびオゾン処理水を NaBH_4 で還元処理した場合、染色体異常誘発性がいかに変化するかを調べた。塩素処理水は処理時pH4.9、消費量600mg-Cl/lのもの、オゾン処理水は処理時pH8.1、消費量2900mg- O_3 /lのものを還元処理した。 NaBH_4 を所定濃度となるように添加し、48時間放置した。このときのpHは、 NaBH_4 未添加試料も含めて塩素処理水は 6.5 ± 0.4 、オゾン処理水は 9.0 ± 0.4 に調整した。結果を付図19に示す。ともに NaBH_4 還元によって染色体異常誘発性は大きく低下していることがわかる。0.2% NaBH_4 処理によってカルボニル基はほぼ還元されたとみなされ、またこのときニトロ基は還元されずに残存していると考えられる。なお、添加した NaBH_4 に染色体異常誘発性がないことも付図20のように確認している。

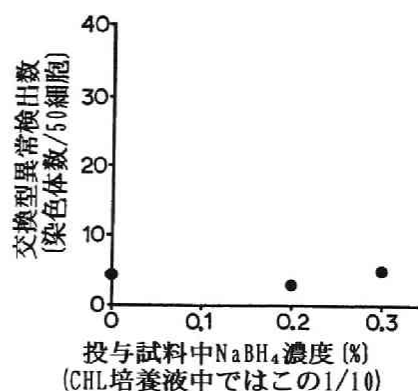
以上の実験結果をまとめると、まずオゾン処理水については、

- 1) 含有カルボニル基量が多い程染色体異常誘発性も強いこと
- 2) ニトロ基の生成量はカルボニル基に比べてはるかに少なく、また含有ニトロ基量と染色体異常誘発性との関係は認められなかったこと
- 3) カルボニル基の選択的還元処理によって処理水の染色体異常誘発性が大きく低下したこと

から、カルボニル基が染色体異常誘発性に大きく寄与していると考えられる。同様に他の消毒処理水についても、生成したカルボニル化合物は染色体異常誘発性に寄与すると予想される。一方、付図19で、塩素処理水については、カルボニル基が還元されて染色体異常誘発性が低下したことが推察されると同時に、有機塩素化合物



付図19 消毒処理水の染色体異常誘発性に対する NaBH_4 還元の影響



付図20 NaBH_4 の染色体異常誘発性
(CHL培養液中ではこの1/10)

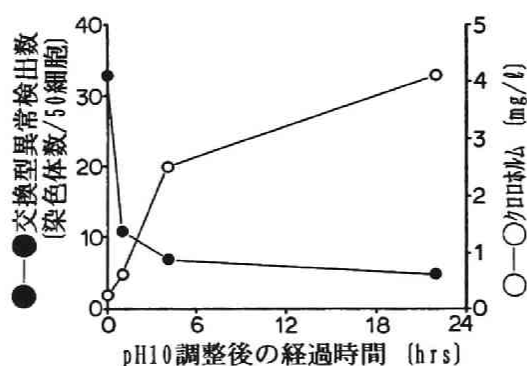
が還元された可能性も否定できない。

(4) 塩素処理水のアルカリ処理の影響

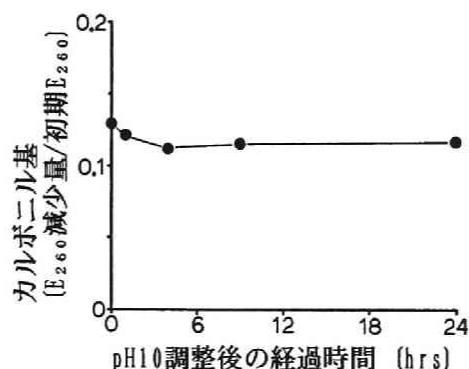
塩素処理水の染色体異常誘発性に対する有機塩素化合物の寄与について考察するため、塩素処理水をアルカリ処理し、副生成物の変化と染色体異常誘発性の変化とを調べた。塩素消費量600mg-Cl/l, 処理時pH5.0の試水を、pH10に調整して放置した。所定時間経過後のクロロホルム濃度および染色体異常誘発性を付図21に示す。クロロホルムが生成することからわかるように、アルカリ条件下では、加水分解によって有機塩素化合物の構造が変化する。それに伴って染色体異常誘発性は大きく低下した。

塩素処理水の変異原性の安定性に対するpHの影響については、すでにいくつかの研究がある。Meierら⁸⁾は、フミン酸を塩素処理した後、pHを11.5にしたところ、23℃では、変異原性は1時間で約1/6, 4時間で約1/10に減少したことを報告している。この変異原性の減少はOH⁻による加水分解速度に依存するため、中性条件下でもおきる。Meierらは、同じ試料をpH7で7日間放置したところ変異原性は1/3~1/4となることを認めた。また、Nazarら⁹⁾は、1,3-ジクロロアセトンと1,1,3,3-テトラクロロアセトンをアルカリ条件下においたところ、これら化合物から塩素イオンが遊離するのが認められ、それに伴って試料の変異原性が低下するのを認めている。さらに、塩素処理水中の強力な変異原物質であるMX (3-クロロ-4-ジクロロメチル-5-ヒドロキシ-2 (5H) -フラノン) もアルカリ側では不安定となることが報告されている¹⁰⁾。

一方、アルカリ処理中のカルボニル基を測定したところ、含有カルボニル基量はほとんど変化しなかった (付図22)。付図21と付図22から、含有カルボニル基量が同じでも、構成する有機塩素化合物の種類が異なれば、染色体異常誘発性も大きく



付図21 塩素処理水のアルカリ処理



付図22 塩素処理水のアルカリ処理におけるカルボニル化合物の挙動

異なることがわかる。付図11において、塩素処理水の染色体異常誘発性が他の3種と比較して強かったのは、カルボニル化合物に加えて有機塩素化合物が寄与しているためと考えている。

3. 4 まとめ

①消毒処理水の染色体異常誘発性に対するカルボニル化合物の役割は重要であると考えられた。

②染色体異常誘発性に対するニトロ化合物の寄与は小さいと推定された。

③塩素処理水の染色体異常誘発性については、カルボニル化合物の寄与の他、処理水中の有機塩素化合物の種類が大きく影響すると考えられた。

まず、カルボニル化合物が消毒処理水の有害性を比較する指標になりうるかにについては、オゾン処理水、二酸化塩素処理水、クロラミン処理水の3種については大まかにはなりうるといえるだろう。それは結局、二酸化塩素およびクロラミンによって生成する有機塩素化合物が少量であるためと思われる。

つぎに、塩素処理水の染色体異常誘発性に対するカルボニル化合物と有機塩素化合物の寄与の割合を概算してみる。実験は琵琶湖水を420倍に濃縮したものを対象としているため、付図2の420mg/lの位置は、琵琶湖水中有機物と消毒剤1mg/lが反応した場合を表すと想定できる。そこで実際の消毒処理は付図2の1000mg/l以下で行われるとすると、塩素処理によるカルボニル基生成量は0.12 (E_{260} 減少量/初期 E_{260})までの値となる。付図11において横軸の値が0.12までの範囲で比較すれば、

塩素処理水の染色体異常誘発性は、含有カルボニル基量から推定される他の3種の処理水の7倍～10倍の強さであると見積もることができる。すなわち、

二酸化塩素、クロラミン、オゾン…カルボニル基生成量

塩素 …カルボニル基生成量×7～10

を指標とすれば、消毒処理水の有害性の大きな比較が可能であることになる。

第4節 結 語

第2節では、既存の染色体異常試験データを解析し、いかなる分子構造が染色体異常誘発性に寄与しうるかを調べた。その結果、ニトロ基とカルボニル基が染色体異常誘発性に寄与している可能性が高い点を指摘した。

第3節では、染色体異常誘発の可能性が指摘されたカルボニル基、ニトロ基が各消毒処理によっていかに生成するかを調べ、処理水の染色体異常誘発性との関係について実験的に検討した。主たる成果を示す。

①消毒処理水の染色体異常誘発性に対するカルボニル化合物の役割は重要であると考えられた。

②染色体異常誘発性に対するニトロ化合物の寄与は小さいと推定された。

③塩素処理水の染色体異常誘発性については、カルボニル化合物の寄与の他、処理水中の有機塩素化合物の種類が大きく影響すると考えられた。

これらの結果、オゾン処理水、二酸化塩素処理水、クロラミン処理水の3種については、カルボニル化合物が消毒処理水の有害性を比較する大きな指標になりうることを指摘した。一方、塩素処理水については、実際の消毒処理の範囲での染色体異常誘発性は、含有カルボニル基量から推定される他の3種の処理水の7倍～10倍の強さであると推定した。

本付録ではカルボニル基量が消毒処理水の有害性の指標になりうることを指摘した。しかし、第1節 目的 の冒頭に述べたように、総括的水質指標としてのバイオアッセイを行うのがやはり基本であり、副生成物の測定による有害性の推定はその補完的役割を果たすものとする。一方、本付録で得られた結果は、バイオアッセイの方法にも有益な情報を提供するものと思われる。詳細は第6章 第4節で考察を行っている。

参考文献

- 1) 石館基監修, 染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー, 1987
- 2) Chaikin, S. W. and Brown, W. G., Reduction of Aldehyde, Ketones and Acid Chlorides by Sodium Borohydride, Journal American Chemistry Society, Vol. 71, pp. 122-125, 1949
- 3) Brown, H. C., Mead, E. J. and Subba Rao, B. C., A Study of Solvents for Sodium Borohydride and The Effect of Solvent and The Metal Ion on Borohydride Reductions, Journal American Chemistry Society, Vol. 77, pp. 6209-6213, 1955
- 4) 熊田恭一, 土壤有機物の化学, 学会出版センター, 1981
- 5) Tsutsuki, K. and Kuwatsuka, S., Chemical Studies on Soil Humic Acids V. Contribution of Carbonyl Groups to The Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Humic Acids, Soil Science Plant Nutrient, Vol. 25, No. 4, pp. 501-512, 1979
- 6) 日本分析化学会編, 分析化学便覧, 丸善, 1981
- 7) Levine, V. E. and Taterka, M., Color Reactions of Aldehydes and Ketones with Vanillin in Alkaline Medium, Analytica Chemica Acta, Vol. 15, pp. 237-245, 1956
- 8) Meier, J. R., Lingg, R. D., and Bull, R. J., Formation of Mutagens Following Chlorination of Humic Acid : A Model for Mutagen Formation during Drinking Water Treatment, Mutation Research, Vol. 118, pp. 25-41, 1983
- 9) Nazar, M. A. and Rapson, W. H., pH Stability of Some Metagens Produced by Aqueous Chlorination of Organic Compounds, Environmental Mutagenesis, Vol. 4, pp. 435-444, 1982
- 10) Kinae, M., Sugiyama, C., Nasuda, M. Y., Goto, K., Tokumoto, K., Furugori, M., and Shimoi, K., Seasonal Variation and Stability of Chlorinated Organic Mutagens in Drinking Water, Proceedings of the First IAWPRC International Symposium on Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants in Water, pp. 476-483, Otsu, Japan, Nov. 25-28, 1991

謝 辞

本論文は、筆者が京都大学工学部衛生工学科在職中に行った研究成果についてまとめたものであります。

本研究の着手段階から本論文の作成段階に至るまで、終始力強いご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学工学部衛生工学科教授 住友恒博士に深く感謝申し上げます。住友恒先生には、筆者が同学科水道工学講座に配属以来、4回生からご指導を頂き、研究内容にとどまらず日々の研究に対する姿勢等数多くのご教示を頂くことができました。ここに心から深く感謝の意を表します。

京都大学教授 宗宮功博士には、論文作成にあたりご懇篤なご指導を賜りました。子細にわたって賜りましたご注意、ご助言は、筆者にとって誠に貴重なものでありました。深く感謝の意を表します。

京都大学教授 松井三郎博士には、論文作成にあたりご懇篤なご指導を賜るとともに資料をも賜りました。また、筆者が環境微量汚染制御実験施設で実験していた折、しばしば激励を頂きました。深く感謝の意を表します。

京都大学助教授 松岡譲博士には、研究遂行上熱心なご指導を賜るとともに、論文作成に当たり子細にわたりご丁寧なご注意、ご助言を頂きました。厚く感謝の意を表します。

京都大学 松本忠生助手には、同じ研究室にて本研究テーマのみならず研究上の有意義なご助言を賜りました。厚く感謝の意を表します。

また、徳島大学工業短期大学部教授 村上仁士博士には、本論文作成中数々の便宜を図って頂きました。深く感謝の意を表します。

さらに本研究は、卒業研究や修士論文作成を通じて、学生諸氏と実験を行い、ともに研究を進めてきました。特に第4章の研究では田中雅人氏（現大阪ガス）、白崎亮氏（現建設省）、第5章の研究では近藤芳樹氏（現東京ガス）、付録の研究では益田信一氏（京都大学大学院）とともに研究を進めました。その他にも、本研究の遂行に当たっては水道工学講座の卒業生、現学生に多くのご助力を得ました。これらの皆様にも厚くお礼申し上げます。

